

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## ENGLISH ABSTRACT

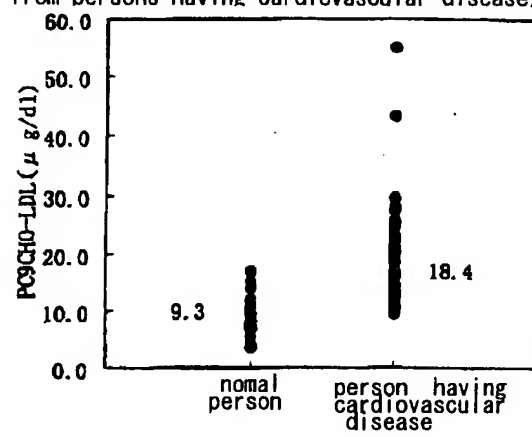
**Publication Number** 09-288106  
**Application number** 08-098708  
**Applicant** Vessel Research Laboratory Co. LTD.  
**Inventor** KIMURA JUNJI, et al.  
**Title** MEASURING METHOD FOR HUMAN LIPOPROTEIN  
OXIDE AND STANDARD SUBSTANCE USED FOR  
IT

### Abstract:

- 5 PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a measuring method, for human lipoprotein oxide, in which lipoprotein oxide such as LDL oxide or the like in circulating blood can be detected with high sensitivity and quantitatively by a comparatively simple procedure.
- 10 SOLUTION: In a measuring method for human lipoprotein oxide, lipoprotein oxide in blood plasma is measured by using an antibody which recognizes an antigen generated by the oxidation of a phospholipid. In the measuring method, a compound obtained by artificially oxidizing the phospholipid
- 15 and/or a combination of the compound of blood plasma protein are used as standard substances for measurement so as to be detected. When an antibody which recognizes an antigen generated by the oxidation of phosphatidylcholine under the coexistence of a peptide or an antibody obtained by
- 20 sensitizing a proper animal by a gruvel-like hardened focus is used as the antibody, an especially good result is obtained. In addition, an antibody which is generated by hybridomacell line FOH1a/DLH3 (Consignment No. FERM P-14153) is used especially suitably.

25

Result using human serum (from normal persons and from persons having cardiovascular disease)



000092  
160  
第31号 昭和62年3月1日発行(毎月1回1日発行)  
第32号(4月1日) 創刊50周年記念号

1-200

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

JB

volume 101, no.3, March 1987

<9>37C160787

F286AAP

101[3]  
87.03

(C4)  
C  
C5 U1

87.03.11

JICST 日本科学技術情報センター

Published Monthly by

THE JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY

JOBIAC 101(3)545-824(1987)

101(3)

## Distinction in the Mode of Receptor-Mediated Endocytosis between High Density Lipoprotein and Acetylated High Density Lipoprotein: Evidence for High Density Lipoprotein Receptor-Mediated Cholesterol Transfer<sup>1</sup>

Masaji MURAKAMI,<sup>2</sup> Seikoh HORIUCHI,<sup>3</sup> Kyoko TAKATA,  
and Yoshimasa MORINO

Department of Biochemistry, Kumamoto University Medical School,  
Kumamoto, Kumamoto 860

Received for publication, October 16, 1986

The interactions of high density lipoprotein (HDL) and acetylated high density lipoprotein (acetyl-HDL) with isolated rat sinusoidal liver cells have been investigated. Cellular binding of <sup>125</sup>I-acetyl-HDL at 0°C demonstrated the presence of a specific, saturable membrane-associated receptor. This receptor was affected neither by formaldehyde-treated albumin nor by low density lipoprotein modified either by acetylation or malondialdehyde, ligands known to undergo receptor-mediated endocytosis by the cells, indicating that the receptor for acetyl-HDL constitutes a distinct class among the scavenger receptors for chemically modified proteins. Parallel binding experiments using <sup>125</sup>I-HDL also revealed the presence on these cells of a receptor for unmodified HDL. The ligand specificities of these two receptors were similar to each other except that the acetyl-HDL receptor was sensitive to polyanions such as dextran sulfate and fucoidin. Interaction of HDL with the cells at 37°C was totally different from that of acetyl-HDL. Cellular binding of HDL was not accompanied by subsequent intracellular degradation of its apoprotein moiety, whereas its cholesterol moiety was significantly transferred to the cells. In contrast, acetyl-HDL was endocytosed and underwent lysosomal degradation as a holoparticle. This shift in receptor-recognition from the HDL receptor to the acetyl-HDL receptor was accomplished by acetylation of ~8% of the total lysine residues of HDL apoprotein. This unique difference in endocytic behavior between HDL and acetyl-HDL suggests a potential link of the HDL receptor to HDL-mediated cholesterol transfer in sinusoidal liver cells.

<sup>1</sup> This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, and by a grant from the Japan Heart Foundation.

<sup>2</sup> On leave from the Department of Neurosurgery of Kumamoto University Medical School.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: HDL, high density lipoprotein; acetyl-HDL, acetylated HDL; LDL, low density lipoprotein; acetyl-LDL, acetylated LDL; f-Alb, formaldehyde-treated serum albumin; TCA, trichloroacetic acid.

Receptor-mediated endocytosis of chemically modified proteins, generally called "scavenger function," is one of the prominent features of macrophages or macrophage-derived cells, and a potential link to atherosclerosis has recently been suggested (1, 2). Ligands so far known to be endocytosed in this way include maleylated albumin (3-5), acetyl-LDL (6-8), malondialdehyde-modified LDL (9, 10), and f-Alb (11-13). The fact that when infused intravenously, these ligands undergo receptor-mediated endocytosis by sinusoidal liver cells, major scavenger cells *in vivo*, makes it feasible to use these cells to elucidate the molecular mechanism of scavenger function of macrophages or macrophage-derived cells (14-16). Previous studies have clarified that these cells express at least two scavenger receptors, one for acetyl-LDL, and the other for aldehyde-modified proteins such as f-Alb (16, 17). However, these receptors have the common property of being sensitive to polyanions such as dextran sulfate and fucoidin (16). This, coupled with the fact that these chemical modifications in general increase the net negative charge and render these ligands highly anionic (1, 6, 18), has strongly suggested that a polyanionic character may be crucial in the recognition by these scavenger receptors, and has led to a prevailing view that LDL chemically modified *in situ* (1, 19), or LDL conjugated with a naturally occurring polyanion such as proteoglycan (20) is responsible for an atherosclerotic process.

In contrast to LDL, a protective role against atherosclerosis has been emphasized with HDL largely due to the epidemiological evidence that plasma HDL levels are inversely correlated with the incidence of coronary artery disease (21). Two major potential functions of HDL are removal of peripheral tissue cholesterol ("reverse cholesterol transport") (22, 23) and transport of cholesterol to various tissues, particularly to steroidogenic tissues for hormone synthesis (24-26). However, the molecular mechanism whereby HDL plays a role in cholesterol metabolism in macrophages or macrophage-derived cells remains unknown except for the suggestion that HDL serves as an acceptor to remove cholesterol from cholesteryl ester-laden macrophages (1). This uncertainty seems to arise from two factors. First, although several laboratories have demonstrated the presence of the HDL receptor in various tissues (27-39), a direct

link between the specific binding of HDL to its receptor and HDL-mediated cholesterol transfer to or from cells is not firmly established. Second, a consensus has not been reached as to whether HDL undergoes typical endocytosis like a ligand known to be endocytosed *via* the LDL receptor pathway, or as to whether the cholesteryl moiety of HDL is processed differently from its apoprotein moiety during the interaction with cells.

During the course of our investigations on the scavenger function of sinusoidal liver cells for chemically modified proteins, we found that acetyl-HDL underwent receptor-mediated endocytosis through a pathway distinct from f-Alb or acetyl-LDL, indicating the presence of a new scavenger receptor for acetyl-HDL. Furthermore, parallel binding experiments using  $^{125}\text{I}$ -HDL also revealed the presence on the same cells of a receptor for HDL. The present study was attempted to inquire into the mechanism by which acetylation of HDL might alter the specificity of receptor-recognition from the HDL receptor into the acetyl-HDL receptor. The results disclosed a clear distinction in the mode of receptor-mediated endocytosis between HDL and acetyl-HDL, suggesting that a membrane receptor for HDL is functionally coupled with HDL-mediated cholesterol transfer into sinusoidal liver cells and probably other cells of macrophage origin. A preliminary account of this work has been published elsewhere (40).

#### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals**—Collagenase and acetic anhydride were obtained from Wako Chemical Co. (Osaka, Japan). Trypsin, fucoidin, and dextran sulfate ( $M_r=5,000$ ) were from Sigma. Heparin-agarose gel was from Pharmacia Fine Chemicals.  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (14.2 mCi/ $\mu\text{g}$  of iodine) was purchased from Amersham and [ $^3\text{H}$ ]cholesteryl oleate (cholesteryl-1,2,6,7- $^3\text{H}$  (N)) (72.0 Ci/mmol) was from New England Nuclear. All reagents used were of the best grade available from commercial sources.

**Lipoproteins**—HDL ( $d=1.063$ – $1.21$  g/ml) and LDL ( $d=1.019$ – $1.063$  g/ml) were isolated by ultracentrifugation from fresh human plasma of normolipidemic subjects after overnight fasting as described previously (16), and these lipoproteins were dialyzed against 0.15 M NaCl and 1 mM EDTA (pH 7.4). The purity of the LDL prepa-

ration was the same as that reported previously (16). The HDL was further treated by heparin-agarose affinity chromatography (41) to remove traces of apoproteins E and B. The HDL preparation thus obtained was found to contain no apoprotein E or B upon sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. These lipoproteins were sterilized by ultrafiltration (0.45  $\mu$ /filters) and stored at 4°C. Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (42) using bovine serum albumin as the standard. Agarose gel electrophoresis was performed using the Pol-E-Film system for lipoprotein electrophoresis (Corning) at pH 8.6 and staining was done with Fat Red 7B.

#### Chemical Modification and Ligand Iodination

Acetyl-HDL and acetyl-LDL were prepared by acetylation with acetic anhydride (16) according to the method of Basu *et al.* (43). To prepare the acetyl-HDL preparations with different degrees of modification, acetic anhydride solution (3, 6, and 10  $\mu$ l) or 50-fold diluted acetic anhydride with dioxane (6 and 30  $\mu$ l) was added to each tube containing 2 mg of HDL in 50% saturated sodium acetate. After incubation on ice for 30 min at pH 7.0, each sample was dialyzed against 0.15 M NaCl and 1 mM EDTA (pH 7.4). The extent of lysine modification by acetylation or malondialdehyde treatment was determined as described (17) according to the method of Habeeb (44) with trinitrobenzenesulfonic acid, as the difference in lysyl residues of modified and unmodified HDL. The extents of lysine modification of the resulting five acetyl-HDL preparations were 8.0, 44.6, 61.2, 71.9, and 89.1%. Except for the experiment shown in Fig. 6, the extent of lysine modification of acetyl-HDL used was 85.1–92.5%. Malondialdehyde-modified HDL (the extent of lysine modification: 92.0%) was prepared as reported previously (40). Unless otherwise specified, HDL, acetyl-HDL, and acetyl-LDL were iodinated with ( $^{125}$ I) (16) to specific radioactivities of 1,600, 2,200, and 1,430 cpm/ng, respectively. Acetylation of HDL under the present conditions did not produce any appreciable polymerized preparation of acetyl-HDL when determined by gel permeation chromatography on a TSK-3000SW column (Toyo Soda), or by electrophoresis on agar gel (see Fig. 6, inset). Furthermore, the acetylation did not significantly affect the content either total chole-

sterol or cholesteryl esters of HDL.

**Labeling of HDL and Acetyl-HDL with [ $^3$ H]-Cholesteryl Oleate**—HDL was labeled with [ $^3$ H]-cholesteryl oleate by a slight modification of the method reported by Blomhoff *et al.* (15). Briefly, to 0.5 ml of freshly prepared human lipoprotein-deficient serum ( $d > 1.25$  g/ml) containing the cholesteryl ester transfer protein (45) was added 50  $\mu$ l of [ $^3$ H]cholesteryl oleate (0.69 nmol) in toluene. Following the evaporation of toluene by flushing with nitrogen and incubation at 37°C for 10 min, 0.1 ml of HDL (0.84 mg) was added and incubation was continued for 7 h at 37°C. The HDL fraction was then reisolated by ultracentrifugation and dialyzed for 24 h at 4°C against 0.15 M NaCl and 1 mM EDTA (pH 7.4). About 25% of the originally added radioactivity was recovered in the final HDL preparation. The incorporation of [ $^3$ H]cholesteryl oleate into the total cholesteryl ester of HDL was about 0.04%. The specific activity of  $^3$ H-HDL preparation was 7,600 dpm/ $\mu$ g of HDL protein, corresponding to about 26,700 dpm/ $\mu$ g of total cholesteryl ester (46). Labeling of acetyl-HDL with [ $^3$ H]cholesteryl oleate was performed in the same way as described above to a specific radioactivity of  $1.72 \times 10^4$  dpm/ $\mu$ g of protein.

**In Vivo Experiments**—Plasma clearance of  $^{125}$ I-acetyl-HDL was determined as described previously (17, 46). A sample containing 3–5  $\mu$ g of  $^{125}$ I-acetyl-HDL in 20 mM sodium phosphate and 0.15 M NaCl (pH, 7.4) was injected intravenously (0.1 ml/100 g body weight) via the right femoral vein of a male Wistar rat (200–220 g). Blood samples (100  $\mu$ l) were withdrawn at various times from the jugular vein into heparinized tubes, followed by centrifugation at  $1,000 \times g$  for 5 min at 4°C. Each plasma aliquot (30  $\mu$ l) was measured for TCA-precipitable radioactivity. The amount of TCA radioactivity in plasma was expressed as a percentage of the injected dose assuming a plasma volume of 3.13 ml/100 g body weight, as described previously (47). The plasma clearance curve of  $^{125}$ I-acetyl-HDL represents a typical pattern obtained from four separate experiments.

To determine the tissue distribution of radioactivity derived from  $^{125}$ I-acetyl-HDL, the animals were sacrificed at the indicated times after injection of  $^{125}$ I-HDL and organs were removed as follows. Prior to excision, the liver was flushed

via the portal vein with 20 ml of ice-cold 0.15 M NaCl. Other organs such as spleen, kidney, heart, lung, thymus, and intestine were also excised and washed similarly with ice-cold saline. These tissues were homogenized in 10% TCA solution and TCA-precipitable radioactivity was determined. Under the present conditions, no appreciable increase in TCA-soluble radioactivity was observed. The value at each time point represents the mean value of triplicate experiments.

To assess the contribution of hepatocytes and sinusoidal cells to hepatic uptake of acetyl-HDL, rats were injected with 5  $\mu$ g of  $^{125}$ I-acetyl-HDL and the liver was perfused *in situ* with a solution containing collagenase 6 min after injection, followed by separation into hepatocytes and sinusoidal liver cells (47). TCA-precipitable radioactivity was determined with each isolated cell population (47).

**Binding Assay**—Rat sinusoidal liver cells prepared as described previously (12) were suspended in Eagle's minimal essential medium containing 3% bovine serum albumin buffered with 20 mM 2-(4-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid to pH 7.4 (buffer A). Binding assay was performed as described previously (16). Briefly, a reaction mixture contained, in a total volume of 0.1 ml of buffer A,  $3 \times 10^6$  cells and a fixed amount of  $^{125}$ I-acetyl-HDL or  $^{125}$ I-HDL in the absence or presence of an unlabeled ligand to be tested. The reaction was initiated by the addition of a radio-labeled ligand and the mixture was incubated on ice for 90 min with several periods of gentle mixing on a Vortex mixer (the time for the binding reaction was determined from a preliminary experiment in which the amounts of these radiolabeled ligands bound to the cells reached a plateau within 60–90 min). Upon termination of the reaction, 1.0 ml of buffer A was added to each tube, followed by centrifugation at  $12,800 \times g$  for 25 s at 4°C. The supernatant was discarded and the pelleted cells were resuspended in 1.0 ml of ice-cold buffer A. The cells were then washed twice more to determine the cell-associated radioactivity. Unless otherwise specified, each value in the figures represents the mean value of triplicate assays.

**Endocytosis and Subsequent Intracellular Degradation**—After preincubation for 10 min at 37°C, the cells ( $1.2 \times 10^7$ ) were incubated at 37°C with 3  $\mu$ g of  $^{125}$ I-acetyl-HDL or  $^{125}$ I-HDL in 2.0 ml of buffer A. At various times, aliquots (0.2 ml) were

placed on the top of a mixture of dinonylphthalate and dibutyl phthalate (1 : 3) in a polyethylene tube, followed by centrifugation at  $12,800 \times g$  for 1 min. A portion (0.1 ml) of the resulting supernatant was assayed for TCA-soluble radioactivity. The remaining supernatant including the oil layer was sucked off, and the radioactivity of the pellet was determined and expressed as cell-associated ligand as described previously (48). To examine the effect of chloroquine, the cells were preincubated at 37°C for 30 min in the absence or presence of 200  $\mu$ M chloroquine and incubated with 3.0  $\mu$ g of  $^{125}$ I-acetyl-HDL at 37°C. The TCA-soluble radioactivity in the cell-free medium of each aliquot was determined as described above.

The difference in endocytic behavior between apolipoprotein and the cholesteryl moiety of HDL was examined by incubating the cells either with  $^{125}$ I-HDL or [ $^3$ H]cholesteryl oleate HDL. The cells ( $1.2 \times 10^7$ ) were incubated at 37°C with 10.8  $\mu$ g (as protein) of either  $^{125}$ I-HDL or [ $^3$ H]cholesteryl oleate HDL. Aliquots were taken at various times and washed three times with ice-cold buffer A, and the cell-associated radioactivity was determined. Under identical conditions, the cells were incubated with 10.6  $\mu$ g of either  $^{125}$ I-acetyl-LDL or [ $^3$ H]cholesteryl oleate acetyl-LDL and processed to determine the cell-associated radioactivity.

**Trypsinization**—The effect of trypsin treatment was examined by the method of Biesbroeck *et al.* (29). Sinusoidal liver cells ( $2.4 \times 10^7$ ) in 4 ml of buffer A were incubated with 80  $\mu$ g (as protein) of  $^{125}$ I-HDL or [ $^3$ H]cholesteryl oleate HDL at 37°C. At indicated times, two aliquots (200  $\mu$ l each) were withdrawn and transferred to tubes containing 1 ml of ice-cold Hanks' solution. The cells in each tube were washed three times with 1 ml of the same ice-cold buffer. The resulting cell pellet in one tube was used to determine the cell-associated radioactivity. The pelleted cells in the other tube were subjected to trypsin treatment by resuspending them in 0.3 ml of the same buffer containing 0.5 mg/ml of trypsin. After incubation for 15 min at 37°C, the cells were sedimented by centrifugation at 4°C and resuspended in 0.8 ml of ice-cold buffer A and washed twice more. The radioactivity of these combined supernatant solutions was determined. The washed pellet was then dissolved in 0.1 N NaOH and its radioactivity was determined. Under identical conditions, the



cells were also incubated with  $^{125}\text{I}$ -acetyl-LDL, which is known to endocytosed through the acetyl-LDL receptor pathway (14-16).

## RESULTS

**Plasma Clearance and Hepatic Uptake of  $^{125}\text{I}$ -Acetyl-HDL**—Upon intravenous injection of a trace amount (3–6  $\mu\text{g}$ ) of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL, its radioactivity was cleared from the blood with an apparent half-life of about 2–4 min (Fig. 1). TCA-precipitable radioactivities incorporated into various organs after injection of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL showed that most of the label was taken up by

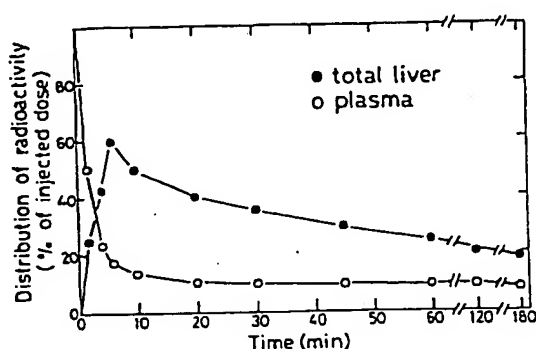


Fig. 1. Plasma clearance and hepatic uptake of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL. Rats were injected intravenously with 3–5  $\mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL. Blood samples were taken at the indicated times and TCA-precipitable radioactivity in plasma (O) was determined and expressed as a percentage of the injected dose as described under "MATERIALS AND METHODS." Hepatic uptake of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL was measured in parallel experiments. At the indicated times after injection of the ligand, TCA-precipitable radioactivity of the liver was determined and expressed as a percentage of the total injected dose (●).

the liver (data not shown). Concurrent with the rapid decrease in its plasma level, the radioactivity incorporated into the liver increased sharply and reached a maximal level 6 min after injection, when the label accumulated in the liver accounted for about 60% of the injected dose, followed by a gradual decrease to 20% within 3 h after the injection.

To determine the cells responsible for the hepatic uptake of acetyl-HDL, hepatocytes and sinusoidal cells were separated from liver excised at 6 min after the injection of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL, when maximal hepatic accumulation was observed (see Fig. 1). As Table I shows, TCA-precipitable cell-associated radioactivity per cell was 2.4-fold higher in sinusoidal liver cells than in hepatocytes. If it is assumed that the cell number of hepatocytes per liver is about 2 times as large as that of sinusoidal cells (47, 49), it is likely that sinusoidal cells may preferentially contribute to the hepatic uptake of acetyl-HDL.

**Binding of Acetyl-HDL and HDL to Sinusoidal Liver Cells**—Figure 2 shows the binding of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL to the cells as a function of concentration. The binding was inhibited by more than 80% by an excess of unlabeled acetyl-HDL. The specific binding, exhibiting a typical saturation curve, indicated the presence of a receptor specific for acetyl-HDL. The Scatchard analysis of this binding process gave a straight line, suggesting a single mode of binding with an apparent  $K_d$  of  $3.5 \times 10^{-8}$  M and  $B_{\text{max}}$  of  $\sim 19.0$  ng of the ligand/ $10^6$  cells (Fig. 2, inset).

In addition to the receptor for acetyl-HDL, the presence of a receptor for unmodified native HDL was also demonstrated by parallel binding experiments using  $^{125}\text{I}$ -HDL (Fig. 3). Although

TABLE I. Distribution of radioactivity of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL between hepatocytes and sinusoidal cells after intravenous injection. Rats were injected with 5  $\mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL and the liver was perfused *in situ* 6 min after injection with a solution containing collagenase. Hepatocytes and sinusoidal cells were isolated and the amount of cell-associated radioactivity was determined as described under "MATERIALS AND METHODS." It was assumed that the liver contains  $1.9 \times 10^5$  cells/g, wet weight, and that hepatocytes and sinusoidal cells constitute 66 and 34% of the hepatic cells, respectively (47, 49). The experiments were performed several times with similar results.

	cpm/ $10^7$ cells	cpm/g of liver	Radioactivity in total liver (% of given dose)
Hepatocytes	747	9,715	26.2
Sinusoidal cells	1,757	10,543	28.4

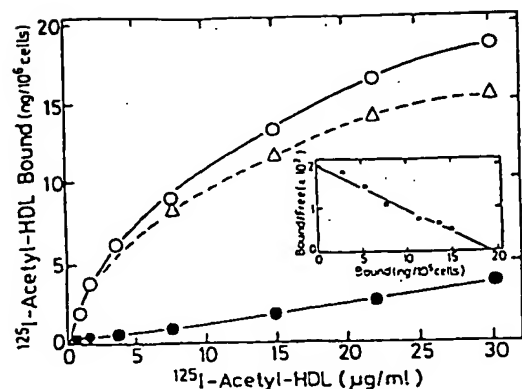


Fig. 2. Binding  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL to sinusoidal liver cells as a function of concentration. Each tube contained  $3 \times 10^6$  cells and increasing amounts of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL in 0.1 ml of buffer A. After incubation for 90 min at  $0^\circ\text{C}$ , the total binding (O) was determined as described under "MATERIALS AND METHODS." Nonspecific binding (●) was determined by parallel incubation in the presence of 1 ml/ml of unlabeled acetyl-HDL. Specific binding ( $\Delta$ ) was obtained by subtracting nonspecific binding from total binding. Assays were run in triplicate. The Scatchard analysis of the specific binding was performed as described (13) and is shown in the inset.

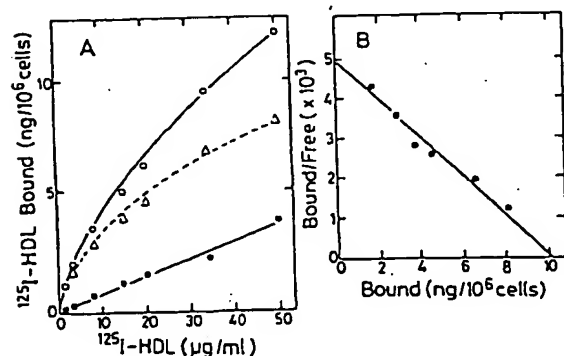


Fig. 3. Binding of  $^{125}\text{I}$ -HDL to sinusoidal liver cells as a function of concentration. A. The cells were incubated on ice for 90 min with increasing amounts of  $^{125}\text{I}$ -HDL. After washing with ice-cold buffer A, total binding (O) was determined as described under "MATERIALS AND METHODS." Nonspecific binding (●) was determined by parallel incubation in the presence of 2 mg/ml of unlabeled HDL. Specific binding ( $\Delta$ ) was plotted after correction for nonspecific binding. B. The Scatchard plot of the specific binding obtained in A.

the replacement by unlabeled HDL was less effective compared to the case of acetyl-HDL, a plot of the specific cellular binding of  $^{125}\text{I}$ -HDL versus its concentration displayed saturation kinetics (Fig. 3A) with an apparent  $K_d$  of  $7.5 \times 10^{-8}$  M and  $B_{\text{max}}$  of  $\sim 10.3$  ng of HDL/ $10^6$  cells (Fig. 3B). Thus, it is evident that sinusoidal liver cells possess on their surface membrane receptors for both HDL and acetyl-HDL.

Figure 4 shows the results of cross-competition experiments. The binding of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL to the cells was inhibited in a dose-related manner by unlabeled acetyl-HDL as well as by malondialdehyde-modified HDL (Fig. 4A). However, unlabeled HDL partially inhibited the specific binding. Similarly,  $^{125}\text{I}$ -HDL binding to the cells was also inhibited to a similar degree both by unlabeled HDL and acetyl-HDL (Fig. 4B). Furthermore, the cellular binding of both ligands was unaffected by EDTA (data not shown). Thus, it is possible

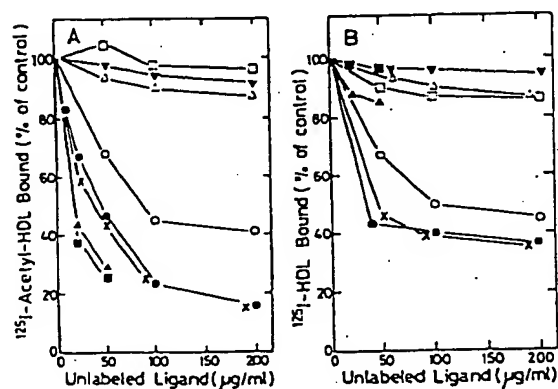


Fig. 4. Effect of several compounds on binding of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL (A) or  $^{125}\text{I}$ -HDL (B) to sinusoidal liver cells. A. Each tube contained, in a total volume of 0.1 ml of buffer A,  $3 \times 10^6$  cells,  $0.5 \mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL, and the indicated concentration of one of the following unlabeled ligands; acetyl-HDL (●), HDL (○), malondialdehyde-modified HDL (×), dextran sulfate (■), fucoidin (▲), acetyl-LDL (□), malondialdehyde-modified LDL (Δ), and f-Alb (▼). After incubation on ice for 90 min, the amounts of the cell-associated radioactivity were determined as described under "MATERIALS AND METHODS." The 100% value for the binding of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL was determined in the absence of any competing compounds. B. The effects of the same compounds on the binding of  $^{125}\text{I}$ -HDL to the cells were determined under the same conditions as described above except that  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL was replaced by  $0.5 \mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -HDL (1,600 cpm/ng).

that specific recognition of acetyl-HDL and HDL by the cells is mediated by the same receptor. However, the effects of polyanionic compounds such as dextran sulfate and fucoidin make this possibility unlikely. Indeed,  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL binding to the cells was affected to a significant degree by these polyanions (Fig. 4A), while they had no effect on  $^{125}\text{I}$ -HDL binding (Fig. 4B). It is reasonable to expect therefore that the acetyl-HDL receptor resembles the HDL receptor, but they are distinct, in a strict sense, from each other in polyanion sensitivity. Our previous study (16) demonstrated that sinusoidal liver cells possess at least two different scavenger receptors for chemically modified proteins; one for acetyl-LDL or malondialdehyde-modified LDL and another for f-A1b. Since these unlabeled ligands were totally ineffective on the binding of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL to the cells (Fig. 4), it is likely that the acetyl-HDL receptor might constitute a distinct class among the scavenger receptors for chemically modified proteins.

**Difference in Endocytic Behavior between Receptors for Acetyl-HDL and HDL**—To test a possible functional difference between the HDL receptor and the acetyl-HDL receptor, endocytic uptake of the ligands, an event occurring subsequent to the initial binding, was examined by incubating  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL or  $^{125}\text{I}$ -HDL at  $37^\circ\text{C}$  with sinusoidal liver cells. As shown in Fig. 5, the cell-associated  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL increased with time and reached equilibrium within 80 min. The intracellular degradation of the ligand, as determined by an increase in TCA-soluble radioactivity in the incubation medium, started at around 15–20 min after the addition of the radiolabeled ligand and continued to increase with time thereafter. Marked inhibition of intracellular degradation of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL by chloroquine, a well-known lysosomotropic reagent (Fig. 5, inset), strongly suggests that the lysosomal protease system is responsible for the intracellular degradation of the endocytosed acetyl-HDL. Thus, it is likely that acetyl-HDL is endocytosed through a typical endocytic pathway, like ligands for other scavenger receptors such as acetyl-LDL (3, 14, 15) and f-A1b (11, 12).

In contrast to acetyl-HDL, HDL behaved quite differently upon incubation with the cells at  $37^\circ\text{C}$ . As Fig. 5 shows, the cell-associated radioactivity increased with time, although the amounts

of  $^{125}\text{I}$ -HDL bound to the cells were about one-third of those of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL. However, the subsequent intracellular degradation did not take place. These results indicate that acetyl-HDL binds to a membrane-associated receptor, followed by internalization and intralysosomal degradation whereas the ligand-receptor complex formed between HDL and its receptor may escape the subsequent intralysosomal degradation. The sharp contrast in endocytic behavior between these two ligands indicates that these receptors are also functionally distinct from each other. In support of this notion is the observation that the intracellular degradation of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL was significantly inhibited by unlabeled acetyl-HDL (40), whereas unlabeled HDL itself had no appreciable effect on this degradation process (Fig. 5, inset).

**Endocytic Uptake of Acetyl-HDL as a Function of Acetylation**—The above finding that acetyl-HDL but not HDL undergoes intracellular degradation subsequent to the cell surface binding warrants the selective determination of the activity of acetyl-HDL receptor by measuring the rate of intracellular degradation of the ligand. We ex-

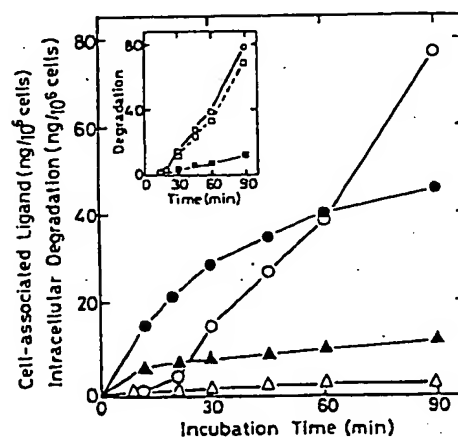


Fig. 5. Endocytic uptake of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL and  $^{125}\text{I}$ -HDL by sinusoidal liver cells. The cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  with  $3\text{ }\mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL. Aliquots were withdrawn at the indicated times to determine cell-associated radioactivity (●) and TCA-soluble radioactivity released into the incubation medium (○). Under identical conditions, the cells were incubated with  $3\text{ }\mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -HDL to determine cell-associated radioactivity (▲) and TCA-soluble radioactivity in the medium (△). The inset shows the effects of chloroquine (■) and unlabeled HDL (□) on the intracellular degradation of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL (○).

amined the correlation between the extent of acetylation of HDL and the generation of the ligand activity for the acetyl-HDL receptor. Five HDL preparations acetylated to different extents were labeled with  $^{125}\text{I}$  and examined for intracellular degradation by the cells. As shown in Fig. 6, significant degradation was observed with an acetyl-HDL preparation in which only 8% of the total lysine residues were modified. Further acetylation progressively increased the rate of lysosomal hydrolysis of the endocytosed ligand, and acetylation by  $>60\%$  led to the generation of an almost maximal ligand activity. Thus, it is likely that exten-

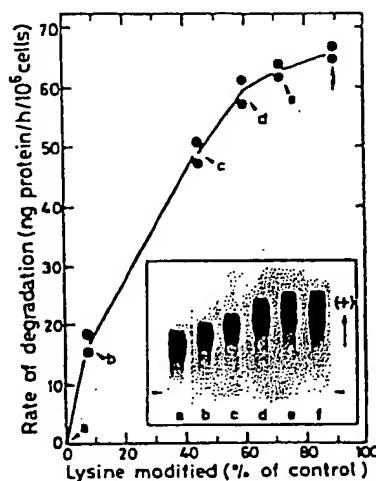


Fig. 6. Correlation of the extent of acetylation with the generation of ligand activity for the acetyl-HDL receptor. Five preparations of acetyl-HDL (samples b-f) with different degrees of acetylation were prepared as described under "MATERIALS AND METHODS." Each preparation was iodinated with  $^{125}\text{I}$  (400–600 cpm/ng) and its intracellular degradation rate by the cells was determined. Each tube containing  $1.2 \times 10^7$  cells and  $3 \mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -labeled preparation in 2.0 ml of buffer A was incubated at  $37^\circ\text{C}$  and aliquots were withdrawn periodically to determine TCA-soluble radioactivity in the supernatant. Assays were run in duplicate. The plot of increase in TCA-soluble radioactivity in the medium against incubation time gave a straight line (see Fig. 5), from which the degradation rate of each  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL preparation was determined and presented as ng/h  $\cdot 10^6$  cells. Parallel incubation of the cells with  $3 \mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -HDL (sample a) did not produce any appreciable increase in TCA-soluble radioactivity, as shown in Fig. 5. The inset shows the electrophoretic patterns on an agarose gel of unmodified HDL (sample a) and five preparations of acetyl-HDL (samples b-f) used in this experiment. Arrowheads show the origin.

sive modification of HDL is not requisite for the generation of the ligand activity, but rather, modification of HDL to a limited extent would be sufficient for recognition by the acetyl-HDL receptor. This notion was also supported by the electrophoretic mobility of these acetyl-HDL preparations on an agarose gel (Fig. 6, inset).

**Disproportionate Behavior of Apoprotein and Cholesterol Moiety of HDL during Interaction with Sinusoidal Liver Cells**—The unique behavior of the HDL receptor shown above (Fig. 5) was further characterized. To determine whether or not the cholesteryl moiety of HDL behaves differently from the apoprotein moiety of HDL in the interaction with sinusoidal liver cells, the cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  with the same protein concentration of  $^{125}\text{I}$ -HDL or  $[^3\text{H}]$ cholesteryl oleate HDL, or with  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL or  $[^3\text{H}]$ cholesteryl oleate acetyl-HDL, followed by determination of the cell-associated radioactivity. The amounts of the cell-associated HDL derived from  $[^3\text{H}]$ cholesteryl oleate HDL exceed those derived from  $^{125}\text{I}$ -HDL by more than 8-fold (Fig. 7A), while the amounts of cell-associated radioactivity derived from  $[^3\text{H}]$ -

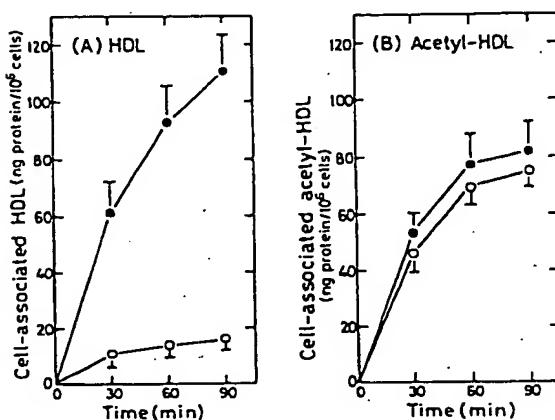


Fig. 7. Different endocytic behavior of apoprotein and cholesteryl moiety of HDL upon interaction with sinusoidal liver cells. A. The cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  with  $10.8 \mu\text{g}$  (as protein) of either  $^{125}\text{I}$ -HDL (O) or  $[^3\text{H}]$ cholesteryl oleate HDL (●) in 2 ml of buffer A. The cell-associated radioactivity was determined in aliquots taken at intervals. B. The cells were incubated in parallel at  $37^\circ\text{C}$  with  $10.6 \mu\text{g}$  (as protein) of either  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL (O) or  $[^3\text{H}]$ cholesteryl oleate acetyl-HDL (●) to determine the cell-associated radioactivity. Each point represents a mean value of duplicate experiments and the vertical bar shows the range.

cholesteryl oleate acetyl-HDL and  $^{125}\text{I}$ -acetyl-HDL were virtually identical during the interaction with the cells (Fig. 7B). A similar experiment with  $^{125}\text{I}$ -acetyl-LDL or  $^3\text{H}$ cholesteryl oleate acetyl-LDL, a ligand known to undergo receptor-mediated endocytosis and intralysosomal degradation by the same cells (14-16), showed that amounts of cell-associated  $^3\text{H}$ cholesteryl oleate acetyl-LDL were almost equal to those of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-LDL (data not shown), exhibiting a pattern quite similar to that observed with acetyl-HDL (Fig. 7B). These findings seem to suggest that acetyl-HDL behaves as a holoparticle during its interaction with the cells just as in the case of acetyl-LDL. In contrast, the disproportionately higher incorporation of HDL cholesteryl moiety into the cells than that of HDL apoprotein moiety clearly indicates that these two moieties of HDL molecules behave quite independently of each other during interaction with the cells. This distinctive feature raises the possibility that the interaction of HDL with sinusoidal

liver cells may lead to the transport of the cholesteryl moiety into the cells.

To further examine the difference in endocytic behavior between cholesterol and the apolipoprotein moiety of HDL, the cells were incubated either with  $^{125}\text{I}$ -HDL or  $^3\text{H}$ cholesteryl oleate HDL at  $37^\circ\text{C}$  and the cells in aliquots taken at various times were washed with ligand-free medium to remove unbound ligands, followed by treatment with trypsin. Trypsin-resistant  $^{125}\text{I}$ -HDL accounted for only 33% of the total cell-associated ligands, whereas the remaining portion (more than 60%) was accounted for by trypsin-releasable HDL (Fig. 8A). However, this pattern was dramatically inverted when the cells were incubated with the same protein concentration of  $^3\text{H}$ cholesteryl oleate HDL; trypsin-resistant HDL represented more than 65% of the total cell-associated ligand (Fig. 8B). As a control, a similar experiment was performed with  $^{125}\text{I}$ -acetyl-LDL. As shown in Fig. 8C, the relation between trypsin-resistant and

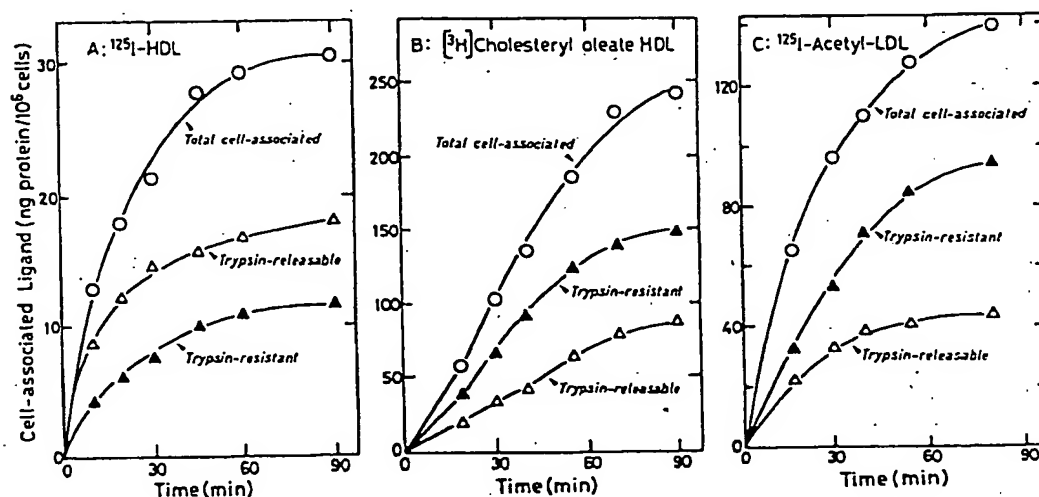


Fig. 8. Effect of trypsin treatment on endocytic uptake of  $^{125}\text{I}$ -HDL and  $^3\text{H}$ cholesteryl oleate HDL by sinusoidal liver cells. A. The cells were incubated with  $80\text{ }\mu\text{g}$  (in protein) of  $^{125}\text{I}$ -HDL in  $4.0\text{ ml}$  of buffer A at  $37^\circ\text{C}$ . Two aliquots ( $200\text{ }\mu\text{l}$  each) were withdrawn from the reaction tube. The cells in one aliquot were washed with ice-cold buffer A to determine total cell-associated radioactivity (O). The cells in the other aliquot were washed to remove unbound ligands and then subjected to trypsin treatment, followed by determination of trypsin-releasable radioactivity ( $\Delta$ ) and trypsin-resistant radioactivity ( $\blacktriangle$ ). B. The cells were incubated in parallel with  $80\text{ }\mu\text{g}$  (in protein) of  $^3\text{H}$ cholesteryl oleate HDL and processed in the same way to determine total cell-associated (O), trypsin-releasable ( $\Delta$ ), and trypsin-resistant ( $\blacktriangle$ ) radioactivity. C. Acetyl-LDL was used as a positive marker ligand to be endocytosed through a receptor-mediated pathway by the cells. Under identical conditions, the cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  with  $60\text{ }\mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -acetyl-LDL and aliquots were processed at various times to determine total cell-associated radioactivity (O), trypsin-releasable radioactivity ( $\Delta$ ), and trypsin-resistant radioactivity ( $\blacktriangle$ ).

trypsin-releasable ligand exhibited a pattern quite similar to that of [ $^3\text{H}$ ]cholesteryl oleate HDL (Fig. 8B). Thus, these data represent further evidence to support a functional involvement of the cellular interaction of HDL in the cholesterol transport process.

## DISCUSSION

The present study has characterized two membrane-associated receptors of sinusoidal liver cells, one for HDL and the other for its acetylated form (acetyl-HDL). Comparison of the endocytic behavior of their ligands revealed an interesting contrast. The binding of HDL to its receptor was followed by selective uptake of the cholesteryl moiety without significant intracellular degradation of the apoprotein moiety. In contrast, acetylation converted HDL into a species which was readily recognized by the acetyl-HDL receptor and endocytosed as a unit for lysosomal degradation. This unique endocytic behavior of the HDL receptor revealed by the contrasted behavior of the acetyl-HDL receptor strongly suggests the direct involvement of the HDL receptor system in cholesterol transfer into sinusoidal liver cells.

An increase in net negative charge upon chemical modification seemed important for the ligand recognition by the acetyl-HDL receptor. However, a plot of the endocytic uptake of acetyl-HDL versus acetylation appeared to show a threshold nature (Fig. 6) in a pattern similar to that of malondialdehyde-modified HDL (40). Thus, the ligand recognition by the acetyl-HDL receptor may require the modification of peptidyl lysine(s) in a particular portion(s) of HDL, rather than a simple increase in net negative charges induced by the chemical modification. The formation of such a receptor-recognition domain(s) has recently been proposed for scavenger receptors for acetyl-LDL (1, 5, 18) and aldehyde-modified proteins (17).

The presence of a high affinity saturable membrane receptor for HDL has been suggested by the binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled apoprotein E-free HDL to cells or membranes from several tissues (24-39). The HDL receptor is quite different from the LDL receptor. The receptor activity is  $\text{Ca}^{2+}$ -independent and relatively insensitive to protease treatment. Furthermore, due mainly to the lack of definite information on the purified HDL receptor, the

nature of the receptor remained controversial until quite recently, particularly as to whether the apoprotein moiety of HDL or its lipid moiety is responsible for the specific recognition by the receptor. Results from several laboratories (24-39) have suggested that the recognition site may reside in the HDL apoprotein, while Tabas and Tall (50) emphasized the importance of the lipid moiety of HDL in the interaction with cultured cells. However, recent reports (51-54) have shown that chemical modification of lysine or arginine residues of HDL apoprotein did not affect its binding activity, whereas modification of its tyrosine residues to 3-nitrotyrosines by tetranitromethane treatment resulted in a complete loss of the specific binding of HDL without affecting its nonspecific binding, strongly suggesting the presence of tyrosine residue(s) at or near the receptor-binding site of HDL apoprotein A-1 or possibly A-2. This may be the case for the HDL receptor of sinusoidal liver cells because tetranitromethane-modified HDL was unable to compete with  $^{125}\text{I}$ -HDL for specific binding to the cells (55). A further characterization of the receptor-binding site of HDL should help to explain why acetyl-HDL inhibited the HDL binding to sinusoidal liver cells (Fig. 4B).

Another feature which differentiates the HDL receptor from the LDL receptor is postreceptor events, phenomena occurring after initial binding of HDL to the surface membranes. HDL binding is followed by intracellular degradation of its apoprotein moiety by some cells (26) but not by others. Recent experiments have established that the cholesteryl ester moiety of HDL behaves differently from its apoprotein moiety during interaction with cells. Biesbroeck *et al.* (29) have shown that although  $^{125}\text{I}$ -HDL displayed saturable binding to human skin fibroblasts, HDL itself did not undergo intracellular degradation. On the other hand, using rat HDL doubly labeled with  $^{125}\text{I}$ -tyramine-cellobiose covalently attached to apoprotein A-I and with [ $^3\text{H}$ ]cholesteryl linolate, Glass *et al.* (56) determined the *in vivo* organ fractional catabolic rates of this reconstituted HDL in rats; the cholesteryl moiety was taken up to a greater degree than apoprotein A-I, particularly by the adrenal, ovary, and liver. This disproportionate uptake of HDL cholesteryl esters relative to the apoprotein moiety was further confirmed *in vitro* with cultured hepatocytes and adrenal cells; the amount of apopro-

tein moiety taken up by adrenal cells was negligible compared with that of the cholesteryl moiety. They suggested therefore that HDL is not taken up as a holoparticle. In this regard, sinusoidal liver cells were similar to adrenal cells in their interaction with HDL; HDL binding to the cells was not followed by intracellular degradation of its apolipoprotein moiety, whereas the cholesteryl moiety was significantly transferred to the cells (Fig. 7). Upon acetylation of the apoprotein moiety of HDL, this characteristic difference in endocytic behavior between the apoprotein and cholesteryl ester moiety was abolished and lysosome-oriented endocytosis occurred as a holoparticle via the acetyl-HDL receptor pathway (Figs. 7 and 8). Thus, it appears that the unique endocytic behavior of HDL receptor might play a major role in cholesterol transfer into the cells.

Schmitz *et al.* (57, 58) have recently provided important information on this unique behavior of the HDL receptor. Using HDL gold particles as a morphological probe, they showed that the derivatized particles bound to mouse peritoneal macrophages and were internalized into the cellular interior via endocytic vesicles. However, no particles were found in lysosomes. Under comparable conditions, biochemical studies (57) showed that interaction of  $^{125}\text{I}$ -HDL with these cells did not result in an appreciable increase in TCA-soluble radioactivity. Moreover, when the cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -HDL and washed with ligand-free medium to remove unbound ligands, followed by further incubation at  $37^\circ\text{C}$ , the cell-associated radioactivity dramatically decreased with a concomitant increase in the radioactivity in the incubation medium as TCA-precipitable forms. Based on these observations, they proposed that HDL is internalized to form endocytic vesicles but resecreted back into the medium without lysosomal degradation (see Fig. 9). This endocytic pathway of HDL bears a close resemblance to the transferrin receptor pathway; transferrin dissociates from its receptor, probably in the prelysosomal compartment, so that it is not degraded but rather released intact from the cells after endocytosis (59, 60).

The mechanism of this receptor-mediated endocytosis and subsequent retroendocytosis was further substantiated by morphological and biochemical studies using monocyte macrophages ob-

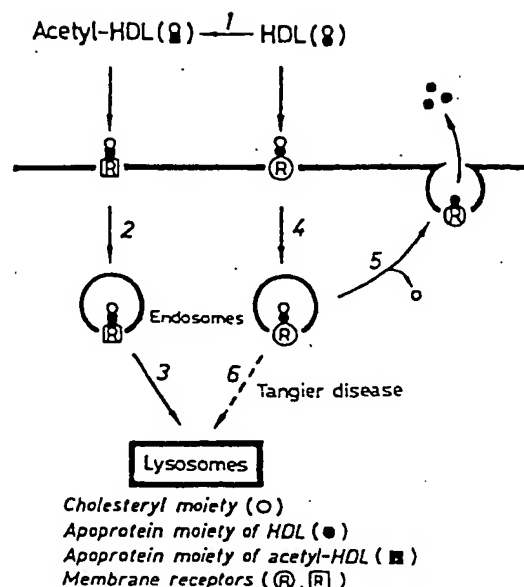


Fig. 9. A proposed model for the mechanism of cholesterol transfer from HDL to sinusoidal liver cells via the HDL receptor pathway. Upon minor modification by acetylation or malondialdehyde treatment, HDL is converted into a species which becomes recognized by the acetyl-HDL receptor (Step 1). A receptor-ligand complex is internalized into the cells (Step 2) and delivered via endosomes to lysosomes (Step 3) for degradation. These cells also express on their surface the receptor for HDL. After the binding to this membrane receptor, HDL is taken up by endocytosis (Step 4). However endocytosed HDL is released outside (Step 5) instead of being delivered to lysosomes (Step 6). During this process, the cholesteryl moiety of HDL is transferred to the cells, while its apolipoprotein moiety remains relatively intact. Thus, significant loss of the cholesterol moiety relative to the apolipoprotein moiety results in an increased density of the released HDL particles (39, 62, 63). In mouse peritoneal macrophages, the endocytic behavior of the HDL receptor is much more characteristic (57). A receptor-ligand complex is internalized to form endosomes (Step 4) which are subjected to retroendocytosis for resecretion of the ligand (Step 5). This sorting mechanism prevents these endosomes from going forward to lysosomes for proteolytic digestion of the ligand. Macrophages from patients with Tangier disease have a genetic defect in this sorting mechanism (58). Thus, endosomes containing HDL have no choice but to be delivered and to fuse with lysosomes for proteolytic degradation (Step 6).

tained from patients with Tangier disease (58). In monocyte macrophages from the patients, HDL was endocytosed to form endocytic vesicles and delivered to lysosomes for degradation, instead of being resecreted back into the external medium (see Fig. 9), indicating that the pathogenesis of Tangier disease is attributable to a genetic defect in a mechanism for intracellular vesicular sorting. Moreover, this finding raised an interesting possibility that the unique behavior of the HDL receptor is linked to the cholesterol influx into macrophages or cholesterol efflux from cholesterol-laden macrophages. The present results obtained from sinusoidal liver cells provide experimental support for this possibility; i) these cells express two distinct receptors on their surface membranes, one for HDL and another for acetyl-HDL, ii) a minor chemical modification of HDL apoproteins (acetylation) readily shifts the receptor recognition from the HDL receptor to the acetyl-HDL receptor, iii), more important, this shift in the receptor recognition is accompanied by a new postreceptor event (a receptor-ligand complex formed between acetyl-HDL and its receptor is taken up and delivered to lysosomes for degradation) (see Fig. 9). In addition, if we take the established fact that scavenger receptors for chemically modified proteins are characteristically expressed by macrophages or macrophage-derived cells (1), it seems reasonable to propose that sinusoidal liver cells might serve as a novel experimental model to elucidate the physiological role of the HDL receptor system.

Our preliminary studies indicate that rat peritoneal macrophages expressed on their surface membranes the acetyl-HDL receptor as well as the HDL receptor and that the unique behavior of HDL was abolished upon minor acetylation of HDL in a similar fashion to that observed in sinusoidal liver cells (Fukuda *et al.*, unpublished observations). Thus, further information on the acetyl-HDL receptor at the molecular level and on its relation to the HDL receptor will facilitate an understanding of the role of HDL in cholesterol metabolism in macrophages or macrophage-derived cells, cells responsible for the formation of foam cells in atherosclerotic lesions (1, 61).

We are grateful to Dr. Seiji Fukuda for valuable discussions and to Prof. Yasuhiko Matsukado for constructive criticism of the manuscript.

## REFERENCES

1. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 52, 223-261
2. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1985) *Nature* 316, 680-681
3. Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., & Brown, M.S. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 76, 333-337
4. Johnson, W., Pizzo, S.V., Imber, M.J., & Adams, D.O. (1982) *Science* 218, 574-576
5. Haberland, M.E. & Fogelman, A.M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 82, 2963-2967
6. Brown, M.S., Basu, S.K., Falck, J.R., Ho, Y.K., & Goldstein, J.L. (1980) *J. Supramol. Struct.* 13, 67-81
7. Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., & Windmueller, H.G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 76, 1746-1750
8. Henriksen, T., Mahoney, E.M., & Steinberg, D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 78, 6499-6503
9. Fogelman, A.M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J.S., & Edwards, P.A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 77, 2214-2218
10. Haberland, M.E., Fogelman, A.M., & Edwards, P.A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 79, 1712-1716
11. Nilsson, M. & Berg, T. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 497, 171-182
12. Horiuchi, S., Takata, K., & Morino, Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 475-481
13. Horiuchi, S., Takata, K., & Morino, Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 482-488
14. Nagelkerke, J.F., Barto, K.P., & van Berkel, T.J.C. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 12221-12227
15. Blomhoff, R., Drevon, C.A., Eskild, W., Helgerud, P., Norum, K.R., & Berg, T. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8898-8903
16. Horiuchi, S., Takata, K., Maeda, H., & Morino, Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 53-56
17. Horiuchi, S., Murakami, M., Takata, K., & Morino, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 4962-4966
18. Haberland, M.E., Olch, C.L., & Fogelman, A.M. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 11305-11311
19. Phillip, D.R., Arnold, K., & Innerarity, T.L. (1985) *Nature* 316, 746-748
20. Vijayagopal, P., Srinivasen, S.R., Jones, K.M., Radhakrishnamurthy, B., & Brenson, G.S. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 873, 251-261
21. Miller, G.J. (1980) *Annu. Rev. Med.* 31, 97-108
22. Glomset, J.A. (1968) *J. Lipid Res.* 9, 155-167
23. Miller, N.E., La Ville, A., & Crook, D. (1985) *Nature* 314, 109-111
24. Chen, Y.-D.I., Kraemer, F.B., & Reaven, G.M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9162-9167



25. Gwynne, J.T. & Hess, B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10875-10883
26. Hwang, J. & Menon, K.M.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8020-8027
27. Fidge, N.H., Nestel, P.J., & Suzuki, N. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 753, 14-21
28. Chacko, G.K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 712, 129-141
29. Biesbroeck, R., Oram, J.F., Albers, J.J., & Bierman, E.L. (1983) *J. Clin. Invest.* 71, 525-539
30. Nakai, T., Otto, P.S., Kennedy, D.L., & Whayne, T.F. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4914-4921
31. Ose, L., Ose, T., Norum, K.R., & Berg, T. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 574, 521-536
32. van Berkel, T.J.C., Kruijt, J.K., van Gent, T., & van Tol, A. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 1002-1008
33. Kovanen, P.T., Schneider, W.J., Hillman, G.M., Goldstein, J.L., & Brown, M.S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 5498-5505
34. Wu, J.-D., Butler, J., & Bailey, J.M. (1979) *J. Lipid Res.* 20, 472-480
35. Tauber, J.P., Goldminz, D., & Gospodarowicz, D. (1981) *Eur. J. Biochem.* 119, 327-339
36. Miller, N.E., Weinstein, D.B., & Steinberg, D. (1977) *J. Lipid Res.* 18, 438-450
37. Bachorik, P.S., Franklin, F.A., Virgil, D.G., & Kwitterovich, P.O., Jr. (1982) *Biochemistry* 21, 5675-5684
38. Hui, D.Y., Innerarity, T.L., & Mahley, R.W. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5646-5655
39. Glass, C., Pittman, R.C., Weinstein, D.B., & Steinberg, D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 80, 5435-5439
40. Murakami, M., Horiuchi, S., Takata, K., & Morino, Y. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 29-35
41. Weisgraber, K.H. & Mahley, R.W. (1980) *J. Lipid Res.* 21, 316-325
42. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
43. Basu, S.K., Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W., & Brown, M.S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 73, 3178-3182
44. Habeeb, A.F.S.A. (1966) *Anal. Biochem.* 14, 328-336
45. Pattnaik, N.M., Nontes, A., Hughes, L.B., & Zilversmit, D.B. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 530, 428-438
46. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1977) *Annu. Rev. Biochem.* 46, 897-930
47. Kanimoto, Y., Horiuchi, S., Tanase, S., & Morino, Y. (1985) *Hepatology* 5, 367-375
48. Horiuchi, S., Kamimoto, Y., & Morino, Y. (1985) *Hepatology* 5, 376-382
49. Blomhoff, R., Holte, K., Naess, L., & Berg, T. (1984) *Exp. Cell Res.* 150, 186-193
50. Tabas, I. & Tall, A.R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 13897-13905
51. Chacko, G.K. (1985) *J. Lipid Res.* 26, 745-754
52. Hoeg, J.M., Demosky, S.J., Jr., Edge, S.B., Gregg, R.E., Osborne, J.C., Jr., & Brewer, H.B., Jr. (1985) *Arteriosclerosis* 5, 228-237
53. Nestler, J.E., Chacko, G.K., & Strauss, J.F., III (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 7316-7321
54. Brinton, E.A., Oram, J.F., Chen, C.H., Albers, J.J., & Bierman, E.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 495-503
55. Murakami, M., Horiuchi, S., Takata, K., Morino, Y., Fukuda, S., & Takahashi, K. (1986) *Seikagaku* (in Japanese) 58, 997
56. Glass, C., Pittman, R.C., Civen, M., & Steinberg, D. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 744-750
57. Schmitz, G., Robenek, H., & Assmann, G. (1985) *EMBO J.* 4, 613-622
58. Schmitz, G., Assmann, G., Robenek, H., & Brenhausen, B. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 82, 6305-6309
59. Newman, R., Schneider, C., Sutherland, R., Vodinelich, L., & Greaves, M. (1982) *Trends Biochem. Sci.* 7, 397-400
60. Octave, J.N., Schneider, Y.J., Trouet, A., & Crichton, R.R. (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8, 283-286
61. Schaffner, T., Tayler, K., Bartucci, E., Fischer-Dzoga, K., Beeson, J., Glagov, S., & Wissler, R. (1980) *Am. J. Pathol.* 100, 57-80
62. Stein, Y., Dabach, Y., Hollander, G., Halperin, G., & Stein, O. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 752, 98-105
63. Bachorik, P.S., Franklin, F.A., Jr., Virgil, D.G., & Kwitterovich, P.O., Jr. (1985) *Arteriosclerosis* 5, 142-152

VOLUME 1 NUMBER 3-4 FEBRUARY 1998

# Fresenius' Journal of Analytical Chemistry

0057

360

98

E0425ABW

1998:360(3/4)

科学文献出版社

科学文献出版社

Editors: W. Fresenius and I. Lüderwald



0037-0633(199802)360:3/4;1-Y

コ

無

BD

I

C2

<9>980269304

1998.03.16



<1>19980269304

Seventh International Symposium  
on Biological and Environmental  
Reference Materials

Antwerp, Belgium, April 21-25, 1997

Guest editors: J. Pauwels, M. Stoepler, and W. R. Wolf

360(3/4)

216 Fresenius J Anal Chem  
Printed on acid-free paper

Now  
available  
online  
<http://link.springer.de>



Springer

Veterinary Science Division, Belfast, N. Ireland), M. Preu for GC/MS analyses, D. Stach for technical assistance, P. de Leuw for helpful discussions (all University of Wuppertal, Department of Food Chemistry) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support.

## References

1. Commission Regulation 92/675/EEC Off J Eur Communities (1992) L 23/8

2. Voldeng NA, Fifer JT, Brown DR (1979) J Heterocyclic Chem 16: 621-622
3. Peron YG, Minor WF, Holdrege CT, Gottstein WJ, Godfrey JC, Crast LB, Babel RB, Cheney LC (1960) J Am Chem Soc 82: 3934-3938
4. Glombitza KW (1964) Liebigs Ann Chem 673: 166-170
5. Provisional official method for benzylpenicillin in muscle (beef) by capillary gas chromatography (1995) Bundesgesundheitsblatt 38: 74-77
6. Blanchflower WJ, Hewitt SA, Kennedy DG (1994) Analyst 119: 2595-2601

Presenius J. Anal Chem (1998) 360: 501-504 © Springer-Verlag 1998

記事番号 0058

F. Schiele, A. Barbier, A. Visvikis, L. Aggerbeck, M. Rosseneu, L. Havekes, M. Hüttinger, C. Profilis, G. Siest

## Feasibility of a recombinant human apolipoprotein E reference material

Received: 23 May 1997 / Revised: 17 November 1997 / Accepted: 17 November 1997

**Abstract** The aim of this work was to prepare a recombinant apo E material and to determine its suitability as a reference material. We produced human apo E3 using recombinant DNA

technology. The cDNA of human apo E3 was cloned in the pARHS bacterial expression vector and used to transfect *E. Coli* BL21 (DE3) cells. The recombinant protein was then purified in one step by affinity chromatography on a Ni-chelated agarose column under denaturing conditions. The purity of the protein estimated by SDS PAGE was greater than 96%. The physicochemical properties and biological and immunological reactivity of the purified recombinant apo E3 were shown to be close to those of the protein purified from human plasma VLDL. A limited batch of lyophilized apo E material was then prepared. The stability of the lyophilized apo E material examined by temperature accelerated degradation was acceptable. No degradation of the measured apo E was observed after storage of the lyophilized material at +4°C and -20°C for 11 months. The reconstituted lyophilized material, in comparison with human fresh serum samples and with apo E purified from human VLDL, showed no major alteration of its immunological reactivity when assayed by immunoturbidimetry or ELISA.

F. Schiele (✉) · G. Siest

Laboratoire du Centre de Médecine Préventive,  
2 Avenue du Doyen Jacques Parisot,  
F-54501 Vandœuvre-Les-Nancy Cedex, France

A. Barbier · A. Visvikis · G. Siest

Centre du Médicament, URA CNRS 597,  
Université Henri Poincaré Nancy I, 30 Rue Lionnois,  
F-54000 Nancy, France

L. Aggerbeck

Centre de Génétique Moléculaire, CNRS,  
F-91198 Gif Sur Yvette, France

M. Rosseneu

Laboratorium Voor Lipoproteïne Chemie/Vakgroep Biochemie,  
Faculteit Geneeskunde, Universiteit Gent, Hospital Str. 13,  
B-9000 Gent, Belgium

L. Havekes

IVVO-TNO, Gaubius Laboratory, P.O. Box 430,  
2300 AK Leiden, The Netherlands

M. Hüttinger

University of Vienna, Department Medical Chemistry,  
Währingerstrasse 10, A-1090 Vienna, Austria

C. Profilis

European Community,

Standards Measurements and Testing Programme,  
Rue de la Loi 200, Brussels, Belgium

## Introduction

Apolipoprotein E (apo E) is a 34.2 kD polymorphic protein containing 299 amino acids. It exists in humans as three major isoforms named apo E2, apo E3 and apo E4. Apo E3 is the most frequent one in Caucasians with a prevalence of 77%. Apo E plays a major role in lipoprotein metabolism through its ability to mediate specific binding of lipoproteins to several hepatic and extrahepatic receptors [1]. The importance of apo E polymorphism in the development of cardiovascular and neurodegenerative diseases is clearly established. This polymorphism strongly influences its serum concentration, which has a direct influence on metabolic processes and lipoprotein metabolism [2-5]. The measurement of apo E concentration, in addition to apo A1 and B, should give more information regarding the health status of patients. Currently apo E is determined using commercially available kits or reagents made within the laboratories performing the measurements. Consequently, there are large discrepancies in the reported physiological serum (plasma) apo E level ranging from 30 to 250 mg/L [6]. As established for apo A1 and B, the use of a common reference material could lead to better coherence of the results. The aim of this work is to study the feasibility of preparing a human apo E material using recombinant DNA technology and to test its suitability as a reference material for the measurement of apo E mass in blood plasma (or serum).

The work involves five main steps 1) optimization of the production using recombinant DNA technology and the purifi-

cation of human apo E; 2) characterization of the physicochemical, biological and immunological properties of the purified recombinant apo E in comparison to protein purified from human plasma VLDL; 3) production of purified recombinant apo E and selection of a matrix to prepare a limited batch of lyophilized material; 4) characterization of the batch of lyophilized apo E material, i.e., homogeneity and stability studies; and 5) interlaboratory trial using the lyophilized apo E material to test its suitability as a reference material. This last step is now in progress.

## Results and discussion

### Production and purification of human recombinant apo E [7]

The human apo E3 cDNA was cloned from total human liver RNA by reverse transcription and specific amplification (RT-PCR). Details about the cloning of the apo E3 cDNA are given in [7] and [8]. In fact, we cloned and expressed the full length apo E3 cDNA. The genotype was confirmed by DNA sequencing of the cloned fragment. This cDNA was subcloned into the prokaryotic expression vector pAHS-2. The resulting plasmid was introduced into *Escherichia coli* strain BL21(D3). The recombinant strains were grown in a Luria and Bertoni medium at 37°C. The addition of  $\beta$ -thiogalactoside (IPTG) resulted in the expression of large amounts of apo E3 protein which was absent in repressed cells. Maximum expression level was obtained between 3 and 4 h.

The purification of the apo E3 from *E. coli* strain BL21(D3) was carried out in one step by affinity chromatography under denaturing conditions. After lysis of the cells, the supernatant was directly applied to a NiPro-Bond agarose column. The bound material was eluted at pH 4.0. The eluted fractions were immediately neutralized and extensively dialyzed against bicarbonate buffer (100 mmol/L) at +4°C, aliquoted and stored at -80°C. This reproducible isolation procedure yielded 15 to 20 mg of more than 96% pure recombinant apo E3 per liter of culture as assessed by SDS-PAGE electrophoresis and immunoblotting.

### Characterization of the purified recombinant apo E3

For comparison purposes human apo E3 was purified from plasma VLDL as described in [7].

**Physicochemical properties [7].** Both recombinant apo E3 and apo E3 purified from human VLDL had similar secondary structure in their native and lipid associated form. The  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet content and random coil structures of the recombinant apo E3 were very close to those of the human protein (Table 1). Moreover the two proteins were equally reactive with phospholipids as shown by the kinetic association with dimyristoyl-phosphatidyl choline (DMPC) vesicles and by the separation and the characterization of the apo E-phospholipid complexes (Table 1). It was concluded that the recombinant apo E3 shared the same physicochemical characteristics as apo E3 purified from human VLDL.

**Immunochemical and biological reactivity [8].** Recombinant and human apo E3 were characterized by surface plasmon analysis (SPR) using a Bialite™ (Pharmacia Biosensor, Sweden). The interaction of immobilized human and recombinant apo E3 with three monoclonal antibodies, i.e., 3B7, ID7 and 3H1, was tested. The two proteins had similar affinities for the three monoclonal antibodies as shown by their interaction kinetics summarized in Table 2.

The biological activity of the recombinant apo E3 was assessed by testing the LDL-receptor binding of apo E enriched

**Table 1** Physicochemical characteristics of the recombinant apo E3 in comparison with the apo E3 purified from human plasma VLDL [7]

	Recombinant apo E3	Human purified VLDL apo E3
Secondary structure analysis		
$\alpha$ -helice (%)	34	36
$\beta$ -sheet (%)	25	25
$\beta$ -turn (%)	16	15
Random coil (%)	26	24
Characterization of the DMPC/apo E complexes		
$\alpha$ -helice (%) <sup>a</sup>	54	59
Stokes radius (Å) <sup>b</sup>	69	67
MW (kDa) <sup>b</sup>	450	430
Phospholipid/protein (molar ratio)	156:1	157:1

<sup>a</sup> According to Compton and Johnson [10]

<sup>b</sup> Calculated from gel filtration elution profile

**Table 2** Equilibrium dissociation constants of their interaction between 3 monoclonal anti-apo E antibodies and recombinant apo E3 in comparison with apo E3 purified from human VLDL [8]

Monoclonal antibodies*	Equilibrium dissociation constant K <sup>D</sup> <sup>a</sup>	
	Recombinant apo E3	Human purified VLDL apo E3
3B7	6.13 ± 0.08	2.35 ± 1.00
3H1	3.62 ± 0.08	2.02 ± 0.21
ID7	19.47 ± 0.12	10.46 ± 1.00

<sup>a</sup> K<sup>D</sup> is the ratio K<sup>diss</sup>/K<sup>ass</sup>, where K<sup>ass</sup> and K<sup>diss</sup> are association and dissociation (s<sup>-1</sup>) rate constants, respectively

\* Monoclonal antibodies were a kind gift from Pr. Yves Marcel

VLDL preparations in macrophages. The results obtained showed that the recombinant apo E3 like the human protein was capable of associating with lipoproteins and of binding to the LDL receptor.

### Preparation of a limited batch of lyophilized apo E3 material

About 13 mg of purified recombinant apo E3 were added to 100 mL of a bicarbonate buffer based matrix to yield a final concentration of 100 ± 20 mg/L. The liquid preparation was dispensed into 0.5 mL vials and lyophilized (Behringwerke, Marburg, Germany). 210 vials of lyophilized recombinant apo E3 were produced.

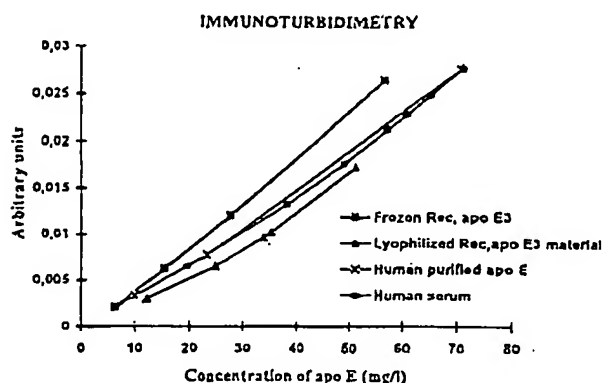
Preliminary studies were performed providing evidence that the selected matrix ensured that the lyophilized material was stable without major alterations to its immunological reactivity. The stability of the lyophilized material was assessed during accelerated thermal degradation. The materials stored at -20°C were stable as the variations observed were within the analytical variation (Table 3). The variation of recombinant or human apo E concentration was less than 5% after storage for 6 months at +37°C and +20°C. After 14 months of storage, recombinant apo E3 seemed to be more stable than human apo E3.

**Table 3** Stability of the lyophilized recombinant apo E3 material in comparison with lyophilized apo E3 purified from human plasma VLDL during accelerated thermal degradation

Duration of storage (days)	Apo E concentration <sup>a</sup> (mg/L). Samples stored at -20°C	Relative concentration of apo E <sup>b</sup> (% of samples stored at -20°C)			
		Temperature of storage			
		+4°C	+20°C	+37°C	+56°C
<b>Feasibility study</b>					
<i>Recombinant apo E3</i>					
20	36.3	—	—	—	92
180	34.3	—	102	97	—
420	31.3	—	106	—	—
<i>Human apo E3</i>					
20	35.5	—	—	—	101
180	34.6	—	98	96	—
420	33.2	—	85	—	—
<b>Batch of recombinant apo E3</b>					
30	75.8	—	—	93	81
90	85.4	—	97	98	77
180	85.6	94	90	90	69
330	80.5	97	89	—	—

<sup>a</sup> Analytical variability of the method: within-day coefficient of variation = 4%; between-days coefficient of variation = 7%

<sup>b</sup> Results of apo E assayed by immunoturbidimetry (apo E AutoDaiichi kit, Daiichi, Tokyo, Japan) and expressed as a percentage of the concentration measured in samples stored at -20°C for the same time and determined in the same assay



**Fig. 1** Immunological behavior of the lyophilized and the frozen recombinant apo E3 in comparison with human VLDL purified apo E3 and human fresh serum

The immunological behavior of the reconstituted lyophilized recombinant apo E3 was studied by measurement of several dilutions of the material in comparison with the frozen recombinant apo E3, the human VLDL purified apo E3, and fresh human serum samples using turbidimetric and ELISA methods. The results obtained demonstrated a similar behavior between the lyophilized recombinant apo E3 and the other tested samples (Fig. 1).

#### Characterization of the batch of lyophilized recombinant apo E3

**Homogeneity.** Apo E concentration was measured in duplicate in 12 different vials taken at random by immunoturbidimetry and by colorimetry according to the method of Lowry [9] using bovine serum albumin (BSA) as standard. The mean  $\pm$  SD values were  $74.5 \pm 2.06$  mg/L (CV = 2.8%) and  $90.7 \pm 3.34$  mg/L (CV = 3.7%) for the immunoturbidimetric and the Lowry's

methods, respectively. The batch was considered as homogeneous since CVs values were < 5%.

**Stability.** After storage of the lyophilized material at +37°C for six months and at +20°C for 11 months the variations of apo E concentration measured by immunoturbidimetry were 10% and 11%, respectively and 3% after storage for 11 months and +4°C (Table 3). The reconstituted material was stable for at least 3 days at +4°C and at room temperature.

#### Conclusion

The results obtained in the feasibility study for the preparation of a human recombinant apo E reference material are encouraging. The recombinant apo E3 shows physicochemical, biological, and immunological properties close to those of the protein purified from human plasma VLDL. The stability of the lyophilized recombinant apo E3 is acceptable without any major alteration of its immunological reactivity. This material is now used in an interlaboratory trial in order to assess its suitability to become a reference material.

As for apo A1 and B, the use of a reference material and well characterized calibrators would reduce discrepancies among laboratories and improve the accuracy of apo E measurement. The diagnosis of cardiovascular disease and the follow-up of treated patients would be thus improved.

**Acknowledgements** We wish to thank Dr. Metzner (Behring Werke, Marburg, Germany) for fruitful discussion and the lyophilization of the batch of recombinant apo E3. This work was supported in part by a grant from the «Region Lorraine» and in part by a grant from the European Communities, Standards Measurements and Testing Programme, contract N° MAT1-CT 94-0046.

## References

1. Weisgraber KH (1994) *Adv Protein Chemistry*. Academic Press, London
2. Davignon J, Gregg RE (1988) *Arteriosclerosis* 8:1-21
3. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J (1992) *J Lipid Res* 33:447-454
4. Bohnet K, Pillot T, Visvikis S, Subolovic N, Siest G (1996) *J Lipid Res* 37:1316-1324
5. Bohnet K, Régis-Bailly A, Vincent-Viry M, Schlenk A, Gueguen R, Siest G (1996) *Ann Hum Genet* 60:509-516
6. Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, Visvikis S (1995) *Clin Chem* 41:1068-1086
7. Pillot TA, Lozac'h R, Visvikis A, Rosseneu M, Vanderkerckhove J, Siest G (1996) *Protein Expression and Purification* 7:407-414
8. Barbier A, Visvikis A, Mathieu F, Diez L, Havekes L, Siest G (1997) *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35:581-589
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) *J Biol Chem* 193:265-275
10. Compton LA, Johnson JR (1986) *Anal Biochem* 155:155-167

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-288106

(43)公開日 平成9年(1997)11月4日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>

G 0 1 N 33/53

識別記号

庁内整理番号

F I

G 0 1 N 33/53

技術表示箇所

W

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 10 頁)

(21)出願番号

特願平8-98708

(22)出願日

平成8年(1996)4月19日

(71)出願人

592246875

株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー  
東京都町田市旭町3丁目6番6号

(72)発明者

木村 順治

東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会  
社ベッセルリサーチ・ラボラトリー内

(72)発明者

内山 英樹

東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会  
社ベッセルリサーチ・ラボラトリー内

(72)発明者

島村 京子

東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会  
社ベッセルリサーチ・ラボラトリー内

(74)代理人

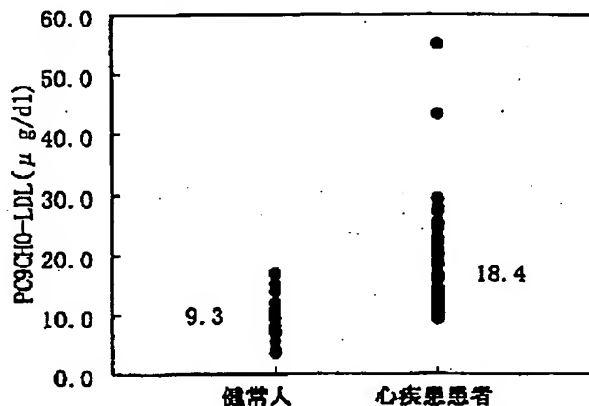
弁理士 八田 幹雄 (外1名)

(54)【発明の名称】 ヒト酸化リポタンパク質の測定法およびこれに用いられる標準物質

(57)【要約】

【目的】 比較的簡単な手順により、循環血液中の酸化 LDL 等の酸化リポタンパク質を高感度にかつ定量的に検出するヒト酸化リポタンパク質の測定法を提供する。

【構成】 リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて血漿中の酸化リポタンパク質を測定するヒト酸化リポタンパク質の測定法において、リン脂質を人工的に酸化させて得られた化合物および／または当該化合物を血漿タンパク質へ組込んだものを測定の前標準物質として用い、その定量を行なうものである。この抗体として、ペプチドの共存下にホスファチジルコリンの酸化により生成する抗原を認識するもの、もしくは、粥状硬化病巣により適当な動物を感作して得られたものを使用した場合には、特に良好な結果が得られるものである。また、本発明においてはハイブリドーマセルライン FOH1a /DLH3 (受託番号 FERM P-14153) により産生される抗体が特に好適に用いられる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて血漿中の酸化リポタンパク質を測定するにおいて、リン脂質を人工的に酸化させて得られた化合物および／または当該化合物を血漿タンパク質へ組込んだものを測定の標準物質として用いることを特徴とするヒト酸化リポタンパク質の測定法。

【請求項 2】 当該リン脂質を酸化して得られた化合物が、グリセリン脂質の 2 位のアシル基にアルデヒド基が結合したものである請求項 1 に記載の測定法。

【請求項 3】 当該リン脂質を酸化して得られた化合物が、1-パルミトイル-2-(9-オキシノナノイル)-グリセロール-3-ホスホコリンまたは 1-パルミトイル-2-(5-オキソパレロイル)-グリセロール-3-ホスホコリンである請求項 1 に記載の測定法。

【請求項 4】 抗体が、ペプチドの共存下にホスファチジルコリンの酸化により生成する抗原を認識するものである請求項 1～3 のいずれかに記載のヒト酸化リポタンパク質の測定法。

【請求項 5】 被験体の血漿および／またはこれより分離したリポタンパク質画分を至適な濃度に希釈した後、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体と接触させ、当該抗体と結合した酸化リポタンパク質をさらに当該リポタンパク質を認識する抗体と接触させることで測定を行い、得られた測定値を、前記標準物質によって得られる検量線と対比することで、被験体血液中の酸化リポタンパク質の量を定量的に求めるものである請求項 1～4 のいずれかに記載のヒト酸化リポタンパク質の測定法。

【請求項 6】 リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて血漿中の酸化リポタンパク質を測定するにおいて用いられる標準物質であって、リン脂質を人工的に酸化させて得られた化合物および／または当該化合物を血漿タンパク質へ組込んだものからなることを特徴とする標準物質。

【請求項 7】 当該リン脂質を酸化して得られた化合物が、グリセリン脂質の 2 位のアシル基にアルデヒド基が結合したものである請求項 6 に記載の標準物質。

【請求項 8】 当該リン脂質を酸化して得られた化合物が、1-パルミトイル-2-(9-オキシノナノイル)-グリセロール-3-ホスホコリンまたは 1-パルミトイル-2-(5-オキソパレロイル)-グリセロール-3-ホスホコリンである請求項 6 に記載の標準物質。

【請求項 9】 被験体の血漿および／またはこれより分離したリポタンパク質画分を各種濃度に希釈した検体に対し、請求項 6～8 のいずれかに記載の前記標準物質を標識化してなるものを所定量添加し、これを、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体と接触させ、標識化標準物質と検体中の酸化リン脂質とを競合反応させることを特徴とする検体中の酸化リン脂質総量の測定

法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト酸化リポタンパク質の測定法およびこれに用いられる標準物質に関するものである。詳しく述べると、本発明は、血液成分を酸化リン脂質を認識する抗体と接触させ、該抗体の試料に対する反応性を測定することによって血液成分中に含まれる酸化リポタンパク質を測定することの特徴とする血液中のヒト酸化リポタンパク質の測定法およびこれに用いられる標準物質に関するものである。本発明はまた、上記測定法を用いて心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患および末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患などの各種循環器系疾患を診断する方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】動脈硬化症は大動脈、冠状動脈、脳動脈及び頸動脈などの筋型動脈に多く発生し、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞などの主因となる疾患である。その原因として血清コレステロールの上昇、血小板凝集、内皮傷害などが提唱されているが、その成因はほとんど解析されていないのが現状である。

【0003】変性リポタンパク質の一つである酸化リポタンパク質と粥状硬化病巣の進展との関連性が、スタインバーグ(Steinberg)らにより指摘されて以来、動脈硬化の進展における酸化リポタンパク質の問題は脚光を浴びるようになってきている(例えば Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L., (1989) N. Engl. J. Med. 320:915)。

【0004】スカベンジャー受容体など酸化を受けたリポタンパク質に対する受容体の存在が明らかにされ、酸化 LDL が、これらの受容体を介して細胞内に取り込まれることによって、泡沫細胞となり粥腫形成のイニシエーションが起こるという仮説、また酸化 LDL が内皮細胞を傷害することで、血小板の粘着凝集や、白血球の集結、血漿成分の血管内への浸潤がおり、これらが引き金になって、平滑筋細胞の遊走や増殖を引き起こすといった仮説が提唱されている。

【0005】酸化 LDL が病巣に確かに蓄積しているかどうかについては、例えば 1988 年にハーバーランド(Haberland)等がマロンジアルデヒドで修飾した LDL に対する抗体；抗 MDA-LDL 抗体により動脈硬化病巣部が染色されることを示し(Herberland, M. E., Fong, D., and Cheng, L., (1988) Science 241:215)、また 1989 年にイラーハーテュアラ(Yla-Herttuala)等は、やはり抗 MDA-apoB 抗体によるイムノブロットング法により、病巣部から抽出されたアポ B (apoB) を検索し、酸化変性を受けた LDL が確かに病巣部から抽出されたと報告している(Yla-Herttuala, S., Parinski, W., Rosenfeld, M. E., P



arthasathay, S., Carew, T. E., Butler, S., Witztum, J. L., and Steinberg, D., (1989) *J. Clin. Invest.* 84:1086)。しかしここで用いられた抗体はマロンジアルデヒドを用いて人工的に修飾したLDLを抗原として得られたものであるが、LDLの酸化生成物だけでなく他の酸化蛋白、例えば酸化アルブミンなども交叉反応を示すという性質を有している。

【0006】しかるに、粥状硬化病巣のホモジネートを抗原としてハイブリドマを作成し、その中から、酸化LDLを特異認識する抗体を産生するハイブリドマを選択すると、特異性の高いモノクローナル抗体が得られることが開示されている (Itabe, H., Takeshima, E., Iwasaki, H., Kimura, J., Yoshida, Y., Imanaka, T., Takano, T., (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (21):15274)。この抗体は、クローンFOH1a/DLH3が産生することから、FOH1a/DLH3と名付けられているが、同抗体が、酸化リポタンパク質と特異的に反応し、正常なリポタンパク質、マロンジアルデヒド化LDL、アセチル化LDLなどとは、交叉反応を示さないことや、同抗体の認識するエピトープは、リポタンパク質の構成成分であるフォスファチジルコリンというリン脂質が酸化されたときに生成することが開示されている。また、同抗体が、ヒト粥状硬化病巣内の泡沫細胞を特異的に認識する抗体であることも開示されている。

【0007】一方、これまでの研究ではLDLの酸化は、血管組織への沈着後の二次的な化学修飾によって引き起こされると考えられているが、炎症部位で発生する活性酵素などにより循環血液中に酸化変成を受けたリポタンパク質が存在する可能性もある。実際に、ヒト血液あるいはそのLDL画分から脂質を抽出し、その中に過酸化リン脂質の存在を立証し、心虚血、糖尿病や肝炎などの疾患時に上昇するとする報告がある (Miyazawa, T., (1989) *Free Radical Biology* 7: 209; Hodis, H. N., Kramsch, D. M., Avogaro, P., Bittolo-Bon, G., Cazzolato, G., Hwang, J., Peterson, H., and Sevanian, A., (1994) *J. Lipids Res.* 35: 669)。しかしながら、その測定法は複雑であり、多数の臨床検体を測定して、血中酸化リポタンパク質の臨床診断的な意義を明らかにするには不向きであるため、血液中の酸化リポタンパク質と疾病との関りについては未だ明確になっていない現状である。酸化LDLが粥状効果病巣の進展と深く関わっているならば、循環血液中の酸化LDL等の酸化リポタンパク質を高感度にかつ定量的に検出することが、病態進展の早期診断に役立つことは明らかであり、そのような方法の開発は強く望まれていた。

【0008】上記したような問題を解決するためには、エピトープが明確でかつ酸化LDLに対する特異性が高く、また各種のリポタンパク質を別々に定量する方法が必要である。本発明者らは、先に、粥状硬化病巣を抗原として得られた抗体FOH1a/DLH3は、リン脂質の酸化によ

り生成するエピトープを認識し、酸化リポタンパク質へ特異的に結合する性質を有することを明らかにした (特開平7-238098号、Itabe, H., Takeshima, E., Iwasaki, H., Kimura, J., Yoshida, Y., Imanaka, T., Takano, T., (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (21):15274)。

【0009】本発明者らは、さらにこのような抗体について鋭意研究を進めた結果、このような抗体こそが、上記した要求される測定法を提供できる最も優れた抗体であることを見出し、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて血漿中の酸化リポタンパク質を測定するヒト酸化リポタンパク質の測定法を提唱した (特願平7-106153)。特に、その抗体が、実際に粥状硬化病巣を適当な動物に感作させて得られたものである場合、また、その認識するエピトープがペプチドの共存下にホスファチジルコリンの酸化により生成する構造に由来する場合、その効果はより確実になる。

【0010】このような抗体の抗原は、実際にヒト組織中で起こるリポタンパク質の生成によって発現し、しかも血漿蛋白質の中でペプチドとリン脂質を両方備えたリポタンパク質の酸化によって生じる可能性が非常に高い。ハイブリドマFOH1a/DLH3の産生する抗体は、まさにその性質を備えている。

#### 【0011】

【発明が解決しようとする課題】ところで、このようにリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて血漿中の酸化リポタンパク質を測定する場合において、その測定結果を定量的に評価するためには、適当な標準物質を用意することが望まれるが、上記したような測定法自体が新規なものであるため、このような標準物質として如何なるものが適当であるかも当然に従来知られていないものであった。

【0012】従って、本発明は、新規なヒト酸化リポタンパク質の定量的な測定法およびこれに用いられる標準物質を提供することを目的とする。本発明はさらに、比較的簡単な手順により、循環血液中の酸化LDL等の酸化リポタンパク質を高感度にかつ定量的に検出するヒト酸化リポタンパク質の測定法およびこれに用いられる標準物質を提供することを目的とするものである。本発明はまた、血液中のヒト酸化リポタンパク質を測定することにより、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痙攣などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患、末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患などを含む、粥状硬化症を主因とする各種循環器系疾患を診断する方法を提供することを目的とするものである。

#### 【0013】

【課題を解決するための手段】上記諸目的は、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて血漿中の酸化リポタンパク質を測定するにおいて、リン脂質

を人工的に酸化させて得られた化合物および／または当該化合物を血漿タンパク質へ組込んだものを測定標準物質として用いることを特徴とするヒト酸化リポタンパク質の測定法によって達成される。

【0014】本発明はさらに、当該リン脂質を酸化して得られた化合物が、グリセリン脂質の2位のアシル基にアルデヒド基が結合したものである上記測定法を示すものである。

【0015】本発明はさらに、当該リン脂質を酸化して得られた化合物が、1-パルミトイル-2-(9-オキソノナノイル)-グリセロール-3-ホスホコリンまたは1-パルミトイル-2-(5-オキソパレロイル)-グリセロール-3-ホスホコリンである上記測定法を示すものである。

【0016】本発明はまた、抗体が、ペプチドの共存下にホスファチジルコリンの酸化により生成する抗原を認識するものである上記測定法を示すものである。

【0017】本発明はさらに、被験体の血漿および／またはこれより分離したリポタンパク質画分を至適な濃度に希釈した後、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体と接触させ、当該抗体と結合した酸化リポタンパク質をさらに当該リポタンパク質を認識する抗体と接触させることで測定を行い、得られた測定値を、前記標準物質によって得られる検量線と対比することで、被験体血液中の酸化リポタンパク質の量を定量的に求めるものである上記測定法を示すものである。

【0018】上記諸目的はまた、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて血漿中の酸化リポタンパク質を測定するにおいて用いられる標準物質であって、リン脂質を人工的に酸化させて得られた化合物および／または当該化合物を血漿タンパク質へ組込んだものからなることを特徴とする標準物質によっても達成される。

【0019】本発明はまた、当該リン脂質を酸化して得られた化合物が、グリセリン脂質の2位のアシル基にアルデヒド基が結合したものである上記標準物質を示すものである。

【0020】本発明はさらに、当該リン脂質を酸化して得られた化合物が、1-パルミトイル-2-(9-オキソノナノイル)-グリセロール-3-ホスホコリンまたは1-パルミトイル-2-(5-オキソパレロイル)-グリセロール-3-ホスホコリンである上記標準物質を示すものである。

【0021】本発明はさらに、被験体の血漿および／またはこれより分離したリポタンパク質画分を各種濃度に希釈した検体に対し、前記標準物質を標識化してなるものを所定量添加し、これを、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体と接触させ、前記標識化標準物質と検体中の酸化リン脂質とを競合反応させることを特徴とする検体中の酸化リン脂質総量の測定法を示すもの

である。

#### 【0022】

【作用】本発明においては、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いることによって酸化リポタンパク質を検出する。このような抗体がリン脂質の酸化物を抗原としていることから、本発明ではリン脂質を化学的に酸化した後、当該抗原物質を純品まで精製したものを標準物質として用いるものであり、その値を当該抗原物質より定量的に評価することができる点で有利である。特に、実施例に示すごとく、この標準物質は、高純度品として得られるリン脂質を化学反応により酸化し、抗原性を持つ酸化物を純品として精製した後に、リポタンパク等の血漿タンパク質に組込んで作成できるため、当該血漿タンパクに対する各種抗体の特異性を維持しながら、単一性、再現性が確保された標準品を得ることができるという点で重要である。

【0023】他の酸化リポタンパク質に対する抗体、例えば酸化リポタンパク質のタンパク部分の酸化物をエпитープとして認識する抗体を用いて酸化リポタンパク質を検出する場合、このような標準品は作成困難である。なぜならば、これらの抗体の認識するエпитープはリポタンパクのポリペプチド鎖の一部として共有結合により結びつけられており、それ自体を合成・単離・精製した後に当該リポタンパク質に組込むことは困難だからである。従ってこのようなエпитープを認識する抗体を用いた場合、標準物質としては、当該リポタンパク質そのものを例えば銅イオン存在下で酸化するか、あるいは、リポタンパク質中あるいは単独の特定のアミノ酸を化学修飾したものを合成して用いることとなる。いずれにせよリポタンパク質そのものを反応させた場合、反応するアミノ酸は多数あり、その反応は複雑で、反応が進みすぎるとタンパク質そのものが分解されてしまうために、反応の程度を調節して再現性のある酸化物を得ることや、まして生成物を分離精製して単一性のある標準物質を精製することは不可能である。また特定のアミノ酸を修飾して標準品とする場合単一性の確保された標準品は得られるが、それを当該リポタンパク質へ組込むことはできないため、リポタンパク質に特異性を持つ抗体の当該標準物質に対する特異性は確保できない。

【0024】なお、上記したようなリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて測定する場合、血漿および／または血清を直接抗体と接触させることで目的は達成され、得られたデータを前記標準物質によって得られる検量線と対比することによって、測定結果をその抗原量として表示することができるが、後述するサンドイッチELISA法などを用いる場合、その測定法に起因する非特異的な吸着などを防ぐため、前もって試料を適当な方法（例えば、超遠心分離）により、あらかじめリポタンパク質画分まで分画して用いてもよい。

【0025】また、このような抗体は、その認識するエ

ピトープがアポ蛋白に依存しないため、血液中の異なるリポタンパク質の酸化物を別々に評価するための方法を提供することができる。このためには、酸化リン脂質特異抗体と当該リポタンパク質特異的な抗体の2種類の組み合わせによる必要がある。この際、どちらかの抗体をプラスチックプレートやガラスビーズなどの平板状または球状等の担体に固相化した、いわゆるサンドイッチELISA法とするのが簡便である。

【0026】この際、どちらかの抗体を固相化するかに制限はないが、酸化リン脂質を認識する抗体の抗体価が高い場合、そちらを固相化した方が抗原を濃縮でき、高感度化できる点で有利である。実施例には、ハイブリドーマFOH1a/DLH3の産生する抗体を固相化して作製したELISA法の例を示すが、本発明がこの実施例に限定されるものではないことはいうまでもないことである。

【0027】さらに、本発明に係る標準物質を用いることにより、競合阻害試験法に基づき酸化リン脂質を定量することができる。すなわち、前記標準物質にビオチン、酵素、放射性同位元素、色素等の標識を結合し、これを検体（血漿）に添加したものを固相化抗体に適用し、検体中の酸化リン脂質と競合反応させることにより検体中の酸化リン脂質を測定するものである。

【0028】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施態様に基づきより詳細に説明する。本発明の測定法は、被験体の血液成分を上記したようなリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体と接触させ、該抗体と特異的に反応した抗原量を、標準物質によって得られた検量線を用いて、定量することにより、血液中に含まれる酸化リポタンパク質を測定することの特徴とするものである。測定は、RIA法、ELISA法、イムノブロット法、免疫沈降法等の公知の方法に基づき行なうことができる。

【0029】さらに、前記したように本発明に係る上記したようなリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体が認識するエピトープがアポ蛋白に依存しないため、当該リポタンパク質に特異的な抗体を組合せることにより、血液中の異なるリポタンパク質の酸化物を別々に評価することできる。このようなリポタンパク質に特異的な抗体としては、特にカイロミクロン、VLDL、LDL、HDL2、HDL3、Lp(a)などの1つないし2つ以上を認識する抗体を用いることができる。特にこの中で、酸化LDLの評価は、酸化LDLと粥状硬化症との関連から重要であるが、これに加えて最近、動脈硬化の独立した危険因子として注目されているLp(a)（例えば、Scanu, A.M., L. Awn, R.M., and Berg, K., (1991) Lipoprotein(a) and atherosclerosis, Ann. Int. Med. 115:209-218）の酸化変成の有無を評価することは重要である。これらのリポタンパク質に対する抗体は市販品として、あるいは公知の手法により容易に入手ないし調製可能である。このように血液中の異なるリポタンパク質の酸化物を別々に評価す

る場合には、上記したような酸化リン脂質特異抗体とリポタンパク質特異抗体のいずれか、望ましくは抗体価が高い方を、平板状または球状等に固相化することが望ましく、特にサンドイッチELISA法を用いることが好ましい。例えば、固相化において用いられる担体としては、多孔プレートなどのプレートやビーズといったこれらの分野において常用されるプラスチック製ないしガラス製の器具等が例示できる。

【0030】被測定試料としての血液成分は、被験体より採血、好ましくはヘパリン等の抗凝固剤を添加して採血して得た血液試料を、遠心分離法等の常法に基づき成分分離して得られた血漿ないし血清成分である。また、測定法に起因する非特異的吸着を抑制し、より高精度の測定とするために、この血漿成分をさらに超遠心分離により分離してリポタンパク質画分としてもよい。

【0031】また、測定に当っては、このような血漿および／またはリポタンパク質画分を、至適な濃度に希釈する。その濃度は測定条件によっても左右されるため一概には規定できないが、例えば、 $0 \sim 500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは $0 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ へと希釈する。希釈媒体としては、特に限定されるものではないが、例えば、生理食塩水、EDTAを含むリン酸緩衝液（PBS）等が用いられ得る。

【0032】至適な濃度とされた血漿および／またはリポタンパク質画分と酸化リン脂質特異抗体との接触は、このような血液成分中に含まれる酸化リン脂質と酸化リン脂質特異抗体との特異的反応が十分に進行するものであればよく特に限定されるものではないが、例えば、 $4 \sim 30^\circ\text{C}$ 、より好ましくは $25^\circ\text{C}$ の下、 $1 \sim 24$ 時間、より好ましくは $1 \sim 2$ 時間程度静置反応させることが望ましい。また、その際の酸化リン脂質特異抗体の濃度としては、血液試料中に存在すると思われるリン脂質の量よりも十分に過飽和な量であればよく、またこの抗体の抗体価、測定方法のタイプによっても左右されるが、例えば、血漿 $1 \mu\text{l}$ 当りに存在する酸化LDL量が $0 \sim 1 \text{ ng}$ 程度であると想定される場合にあって、酸化リン脂質特異抗体として後述するようなDLH3抗体を用いる場合、当該血漿 $1 \mu\text{l}$ 当りに $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g}$ 、より好ましくは $0.5 \mu\text{g}$ 前後であることが望ましい。

【0033】次に本発明の測定法において用いられるリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体について詳述する。このような抗体を得る方法としては、特に限定されるものではないが、好ましくは以下に述べるように粥状硬化病巣を適当な動物に感作する方法であり、一般的な細胞融合法に基づき次のような手法により得られるハイブリドーマセルラインにより産生される。

【0034】ハイブリドーマ作製に用いられる動物種としては、特に限定されるものではなく、従来使用されているマウス、ラット、ハムスター等が使用可能であるが、特に入手および取扱いの容易性からBalb/cマ

ウスが好ましく、主にこれらの動物の脾細胞が用いられる。また、ヒトのリンパ節細胞や末梢リンパ球を用いることもできる。

【0035】これらの動物に対する免疫用の抗原は、粥状硬化病巣より調製される。例えば、動脈硬化症患者の死亡直後における剖検あるいはバイパス手術等において取出された病変血管を入手し、この病変血管から粥状硬化病巣を含む血管部を切出し、緩衝液中で血管外膜部を剥離除去した後、病巣の内膜と中膜部(intima and media)をホモジナイザーを用いて冷却下、好ましくは氷冷却下にホモジナイズし、静置後得られる上清を抗原液とする。さらに必要に応じて、静置後に遠心処理を行ない、得られたペレットに緩衝液を加えて同様の操作を行ない、得られる上清を前の上清と合せて抗原液とすることもできる。このようにして調製された抗原液は、例えばアルゴン等の不活性ガスで置換の後、使用直前まで凍結保存することが望ましい。

【0036】次いで、このようにして調製された粥状硬化病巣のホモジェネートからなる抗原を、所定蛋白(抗原)濃度として、前記したような動物種に免疫する。なおこの際、必要に応じて、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント等のアジュバントを添加してもよい。

【0037】投与量は、動物種によって左右されるが、マウスの場合、初回免疫で2.0～60 $\mu$ g(蛋白)/匹、より好ましくは40 $\mu$ g(蛋白)/匹程度である。

【0038】さらに、初回免疫の後、例えば、2週間および4週間程度の間隔で、初回免疫と同量ないしそれ以下の蛋白量で、追加免疫を行なうことが望ましい。

【0039】最終免疫の後、2～3日後に免疫動物から採血し、ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法、イムノブロット法等の検定法により、血清抗体価上昇の確認を行ない、抗体価上昇の認められた免疫動物をスクリーニングする。

【0040】スクリーニングされた免疫動物から脾細胞、あるいはリンパ節などから抗体産生細胞を採取し、約37℃に加温したRPMI培地、DMEM培地等の維持培地で洗浄、懸濁し、生細胞数を計測する。

【0041】一方、HGPRT(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase)欠損株の腫瘍細胞を、胎児ウシ血清(FCS)添加RPMI培地、FCS添加DMEM培地等の増殖培地において増殖させ、対数増殖期になるように培養しておく。なお、HGPRT欠損株の腫瘍細胞としては、例えば、P3/X63-Ag8(X63)(カッコ内は略名以下同じ)、P3/NSI-1-Ag4-1(NS-1)、P3/X63-Ag8.U1(P3/U1)、Sp2/0-Ag14(Sp2/0)、FO、210.RCY3.Ag 1.2.3.(Y3)、U-266AR1(SKO-007)、LICR-LON-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)などの公知の腫瘍細胞を、使用する動物種に応じて用いることができる。対数増殖期にある腫瘍細胞を、前記抗体産生細胞の細胞数に対して腫瘍

細胞の細胞数が1:1～1:10となるように調整し、約37℃に加温したRPMI培地、DMEM培地等の維持培地で洗浄して細胞融合を阻害するFCS成分を除去する。

【0042】そして、細胞数を調整された抗体産生細胞と腫瘍細胞を、例えばガラスチューブ等の容器内で混和し、遠心してペレットを得、上清をなるべく除去する。なお、この操作を含めて以下の操作は、20～37℃、より好ましくは約37℃の温度条件下で行なうことが望ましい。

【0043】次いで、得られたペレットに対して、0～37℃、より好ましくは約37℃に加温された細胞凝集性媒体を、ペレットをほぐしながら、ゆっくりと添加する。細胞凝集性媒体としては、ポリエチレングリコール(PEG)、リゾレシチン、グリセロールオレイン酸エステルなどの化合物、あるいは不活化されたセンダイウイルス(HVJ)、麻疹ウイルス、ニューカッスル病ウイルス等のパラミクソウイルスなどが使用可能であるが、このうち特にPEGが好ましい。PEGを使用する場合には、例えば、RPMI培地、DMEM培地等で、その平均分子量にもよるがPEG4000の場合は45～50重量%程度の濃度に希釈して用いることが望ましい。

【0044】細胞凝集性媒体の添加後、さらに1～2分間程度攪拌した後、RPMI培地等の維持培地を、2～3回に別けてゆっくりと添加する。その後、PEG等の細胞凝集性媒体を除去するため、例えば800～1200 $\times$ g、3～5分間という弱い条件で遠心し、上清を除去する。

【0045】続いて、得られたペレットをほぐしながら、FCS添加HAT培地等の選択培地を、脾臓細胞濃度が $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/mlとなるように、ゆっくりと添加し、96穴プレートのような多穴プレートの各ウェルに分注し、温度約37℃、CO<sub>2</sub>濃度約7%、湿度100%の条件下で培養する。なお、培養期間中、細胞の状態にもよるが、2～3日程度の間隔で、液替えを行なう。なお、培地条件としては、上記に例示したようなものに限定されるものではなく、これ以外にも、例えば、最初にFCS添加RPMI培地等の増殖培地をペレットに添加し、培養開始後、選択培地を各ウェルに添加するといった態様とすること等も可能である。

【0046】融合しなかった細胞は、3日目あたりから急速に死滅しはじめ、7日程度で完全に死滅する。一方、融合に成功した細胞、すなわち、ハイブリドーマはこのころよりコロニーを形成しはじめる。ハイブリドーマコロニーの形成が認められたウェルより次に述べるようなスクリーニングを開始し、必要に応じて24穴プレート等のより大きなプレートに継代していく。

【0047】スクリーニングは、RIA法、ELISA法、イムノブロット法等によって行なうことができるが、このうち好ましくはELISA法である。抗原としては、CuSO<sub>4</sub>と3時間以上反応させることにより得

られた酸化LDLを使用する。必要に応じて、未変性のLDLを併用してもよい。特に好ましくはホスファチジルコリンの酸化により生成する抗原であり、これをペプチドの共存下に認識するものが望ましい。あるいはリン脂質を何らかの方法により酸化し、そこから抗体に対する反応性を持つ酸化生成物を単離精製した後、その酸化生成物を所定量、LDL分画に添加して得られた酸化LDLを抗原として用いてもよい。各アッセイ法に基づき、ハイブリドマコロニーの形成が認められたウェルから採取した培養上清を、スクリーニングし、酸化LDLとの反応で陽性（かつ未変性LDLとの反応で陰性）となる細胞株を選択する。

【0048】そして、スクリーニングで陽性となったウェルから直ちにクローニングを行なう。クローニングは、限界希釈法(limiting dilution)、単個細胞マニピュレーション法(single cell manipulation)などを用いて行なうことができるが、限界希釈法の方が技術的に容易であるため好ましい。

【0049】クローニングした細胞が再び増殖してきたら、上記と同様にしてスクリーニングを行ない、再度クローニングを繰り返し、未変性LDLとは反応せず、酸化LDLとのみ反応する高産生細胞株を同定する。

【0050】なお、得られたハイブリドマの保存法としては、特に限定されるものではないが、例えば、凍結保存用のバイアルになるべく多くの細胞、例えば $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 個程度を、90%FCS、10%ジメチルスルフォキシド(DMSO)1~2ml程度に懸濁して、液体窒素中に凍結保存する方法が適当である。

【0051】Balb/cマウスを用いて上記したような細胞融合操作により、未変性のLDLとは反応せず、酸化LDLとのみ反応する細胞株を得ることができることが、前述の論文(Itabe, H., Takeshima, E., Iwasaki, H., Kimura, J., Yoshida, Y., Imanaka, T., Takano, T., (1994) J. Biol. Chem. 269 (21):15274)に開示されている。特に、同論文に記載されている抗体FOH1a/DLH3は、マロンジアルデヒド修飾LDL(MDA-LDL)、アセチル化LDL(AcLDL)とは、反応しない点で、特に好ましいモノクローナル抗体である。この抗体を産生するマウスマウスハイブリドマセルラインFOH1a/DLH3は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、受託番号FERM P-14153を付与されている。

【0052】モノクローナル抗体FOH1a/DLH3は、LDLを銅イオンを用いて人工的に酸化したLDLに反応するが、未変性のLDLには反応せず、他の方法（たとえばマロンジアルデヒド化や、アセチル化など）でLDLを修飾したものにも反応しない。また他の血清蛋白質たとえばアルブミンやグロブリンを酸化させたものにも反応しない。しかし、LDLとは異なるリポタンパク質である高比重リポタンパク質(HDL)を酸化したものには反応する。

【0053】しかしながら、本発明に係るリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を得る方法としては、上記のごとき粥状硬化病巣を適当な動物に感作する方法に限定されるものではなく、これ以外にも例えば酸化LDLを免疫源とする方法、アポタンパク質あるいは、その構成ペプチドの一部の共存下で、リン脂質を酸化させたものを免疫源とする方法などが考えられる。

【0054】しかし、本発明において用いられる標準物質は、測定に用いられる抗体が上記したようにリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体であることから、リン脂質を人工的に酸化させて得られた化合物および/または当該化合物を血漿タンパク質へ組込んだものとすることができる。

【0055】リン脂質を人工的に酸化して得られる化合物としては、リン脂質の脂肪酸残基のいずれかの炭素原子にアルデヒド基を結合してなるもの（末端の炭素原子を修飾してアルデヒド基としたものを含む）であればよいが、好ましくはホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセリンなどのグリセロリン脂質、特にホスファチジルコリンを酸化したものが望ましい。一般に、グリセロリン脂質では、グリセロールの1位に飽和アシル、アルケニルあるいは飽和アルキル基が結合し、グリセロールの2位に不飽和アシル基が結合しているものが多いため、この2位の不飽和アシル基の不飽和結合部にアルデヒド基を結合させることにより所望の化合物とすることができる。しかしながら、もちろんアルデヒド基を結合させる脂肪酸残基としては、このような2位のアシル基に限定されるものではなく、いずれのものであってもよい。

【0056】さらに、当該リン脂質を酸化して得られた化合物としては、1-パルミトイル-2-(9-オキソノナノイル)-グリセロール-3-ホスホコリンまたは1-パルミトイル-2-(5-オキソパレロイル)-グリセロール-3-ホスホコリンが特に好ましい。

【0057】このようにして生成したリン脂質を人工的に酸化して得られる化合物を、反応系から単離、精製して、そのまま標準物質として用いることができるが、より好ましくはこの化合物を、各種血漿タンパク質、特にリポタンパク質、さらに好ましくは例えばLDLのような測定対象となるリポタンパク質に対して、任意に既知濃度添加ないし組込むことにより、標準物質を調製することが望ましい。このように当該化合物を血漿タンパク質に添加して標準物質を調製する場合の化合物の添加量は、使用する抗体種、血漿タンパク質種、および当該化合物種によって左右されるため一概には規定できないが、予め各種添加量において抗体の反応性を検討する予備実験を行ない、当該抗体に対して常に一定の反応性を示す添加量を決定すればよい。

【0058】本発明に係る測定法においては、実際の検体の測定に先立ち、このようにして調製される既知濃度の当該化合物を含有する標準物質を用いて、同様の測定工程を踏み、抗体の反応性と酸化リン脂質濃度との関係に係る検量線を作成しておき、実際の検定によって得られた結果をこの検量線に対比させることで、定量的に酸化リポタンパク質量を測定することができる。

【0059】また、上記のごとき標準物質を用いることにより、競合阻害試験法に基づき検体中の酸化リン脂質総量を定量することも可能である。具体的には、まず、既知濃度の前記化合物を含有する標準物質を用意し、これをビオチン、酵素、放射性同位元素、色素等によって標識化する。一方、検体、例えば血漿を、リン酸緩衝液等の適当な希釈剤によって種々の濃度に希釈する。各希釈割合の血漿試料群のそれぞれに一定量の標準物質を添加し、これを固相化抗体に適用し、検体中の酸化リン脂質と競合反応させる。また比較対照として、前記添加量と同量の標準物質のみを別途固相化抗体に適用し反応させる。そして、比較対照（検体非存在下）で得られた抗体結合標準物質質量に対する検体存在下で得られた抗体結合標準物質質量の割合を求め、この割合が50%となる試料を決定し、この試料の検体希釈率から検体中の酸化リポタンパク質総量を求めるものである。

【0060】なお、本発明の上記測定方法、ないし測定方法に用いられる抗体を産生するハイブリドーマを得るにおいて必要とされる人工的な酸化リポタンパク質の生成条件としては、次のようなものが考えられる。すなわち、ヒト正常血清から、例えば遠心沈降法などによりリポタンパク質分画を得、この分画を必要により透析、脱塩によって精製処理した後、蛋白濃度0.1~1mg/ml、より好ましくは0.2mg/ml、CuSO<sub>4</sub>濃度2.5~25μM、より好ましくは5μMの割合で、リポタンパク質分画にCuSO<sub>4</sub>を添加し、約37℃の下に、3~24時間反応させるものである。あるいは上記したようにリン脂質を何らかの方法により酸化し、そこから抗体に対する反応性を持つ酸化生成物を単離精製した後、その50~5000ngを上記のごときリポタンパク質分画1ml（蛋白濃度0.1~2mg/ml）に加え調製するものである。

#### 【0061】

【実施例】次に、実施例を示して本発明による酸化リポタンパク質の測定法および酸化リン脂質の定量法をより具体的に説明する。

#### 【0062】実施例1

##### (1) 酸化LDL標準物質の調製

LDLは、EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿から超遠心分離法にて比重1.019~1.063の部分回収して用いた。LDLの純度は、アガロース電気泳動法にて単一の鋭いバンドを与えることを使用に確認した。0.25mMEDTAを含むPBS溶液（pH7.

4）に対して十分に透析し、蛋白定量からLDL蛋白1mg/ml 0.25mMEDTA-PBS溶液（pH7.4）として4℃で保存した。

【0063】1-パルミトイル-2-（9-オキソノナノイル）-グリセロール-3-ホスホコリンおよび1-パルミトイル-2-（5-オキソパレロイル）-グリセロール-3-ホスホコリンは、文献[K. E. stremler et al., J. B. C. 266(17) (1991) 11095-11103]に記載の方法に従って調製した。1-パルミトイル-2-オレオイル-グリセロール-3-ホスホコリンおよび1-パルミトイル-2-アラキドノイル-グリセロール-3-ホスホコリン

[Avanti社製]のクロロホルム溶液にオゾンガスを吹き込み、生成したジアシルグリセロールホスホコリンのオゾンド体をジメチルスルフィドにより還元して合成した。得られた酸化物を薄層クロマトグラフ法により展開溶媒

（クロロホルム：メタノール：水=10：5：1）の条件で展開し、1-パルミトイル-2-（9-オキソノナノイル）-グリセロール-3-ホスホコリンおよび1-パルミトイル-2-（9-オキソパレロイル）-グリセロール-3-ホスホコリンを単離した。得られた1-パルミトイル-2-（9-オキソノナノイル）-グリセロール-3-ホスホコリンおよび1-パルミトイル-2-（5-オキソパレロイル）-グリセロール-3-ホスホコリンの純度は、逆相HPLC（ODSカラム、メタノール：20mM塩化コリン水溶液：アセトニトリル=875：100：25）にて単一ピークを与えることを使用に確認し、クロロホルム-エタノール（1：1）溶液中にて-20℃で保存した。

【0064】酸化LDL標準物質（PC9CHO-LDL、およびPC5CHO-LDL）は、上記LDL溶液（1ml）に上記1-パルミトイル-2-（9-オキソノナノイル）-グリセロール-3-ホスホコリン（PC9CHO）または1-パルミトイル-2-（9-オキソパレロイル）-グリセロール-3-ホスホコリン（PC5CHO）50~5000ngのDMSO溶液（100μl）を加えることにより調製した。

【0065】LDLに対するPC9CHOの至適添加量を検討した結果、図1に示すようにLDL（1mg/ml）に対して、PC9CHOを5μmol以上添加することでDLH3抗体に対して常に一定の反応性を示す酸化LDL標準品を得ることが可能であった。

#### 【0066】(2) サンドイッチELISA分析

プレートにPBSで希釈下DLH3抗体（各1μg/ウェル）を加えて、4℃で16時間放置した。抗体溶液を捨て、1%BSA-TBS溶液（pH8.0）350μlを加えて、室温で2時間放置してブロッキングした後、0.05%Tween20を含むトリス緩衝生理食塩水（0.05%Tween-TBS pH8.0）で3回洗浄する。その後、酸化LDL標準品（PC9CHO-LDL 0~80μg/dl）、および1%BSA-4%PEG-0.25mMEDTAを含む10mM PBS溶液（pH7.



4)で1600倍希釈したヒト血漿を分注し、室温で2時間放置した後、0.05%Tween-TBS (pH8.0)で3回洗浄する。1%BSA-PBS溶液で1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ApoBモノクローナル抗体(抗ApoBモノクローナル抗体(MOAB ANTI-APOB MIA 1610, MEDIX BIOTECHINC.社製)をマレイミド法を用いてペルオキシダーゼで標識して調製した。)100 $\mu$ lを加え、室温で30時間放置する。0.05%Tween-TBS (pH8.0)で3回洗浄した後、 $\alpha$ -フェニレンジアミン3mg/mlを含む0.03%過酸化水素水100 $\mu$ lを加えて発色させ、20分後に2N硫酸50 $\mu$ lで反応を停止させて492nmの吸光度を測定する。

【0067】(3)ヒト血漿(健康人および循環器系疾患患者)を用いた分析結果

臨床検体としては、横浜栄共済病院の循環器内科外来の患者(49名)を対照に測定した。循環器疾患としては、高血圧、冠動脈狭窄、狭心症、陳旧性心筋梗塞、重症冠硬化症を単独あるいは複数合併している患者を対象とした。健康者は、上記の循環器疾患を明らかに持たない健康者(30名)を対象とした。酸化LDL(PC9CHO-LDL)を標準品とした典型的な検量線および臨床検体について分析した結果を図2および図3にそれぞれ示した。

#### 【0068】実施例2

ビオチン標識化PC9CHOによる血漿中の総酸化ホスファチジルコリン量の定量

DLH3抗体[10 $\mu$ g/ml 50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)]を96穴プレートに1ウェル当り1 $\mu$ g/100 $\mu$ lづつ加え、4℃で1晩静置した。0.05%Tween-TBSで3回洗浄後、1%BSAを含むTBS溶液(pH8.0)350 $\mu$ lを加え室温で2時間ブロッキングした。0.05%Tween-TBSで3回洗浄後、実施例1におけると同様にして調製されたPC9CHOとビオチンヒドロジド(ピラス社製)とを反応して得られたビオチン標識化PC9CHO(24 $\mu$ g/ml)、および1%BSA-0.25mM EDTAを含む10mM PBS溶液(pH7.4)で10~100000倍に希釈したヒト血漿(50 $\mu$ l)を良く混合して加え、25℃で1時間放置した。0.05%Tween-TBSで5回洗浄した後、HRP標識ストレプトアビジン(Vector社製)(5 $\mu$ g/1%BSA-10mM PBS-0.05%TBS-Tween)100 $\mu$ lを加えて25℃にて5分間放置した。0.05%Tween-TBSで5回洗浄した後、OPD試薬にて発色させ、2N硫酸溶液で反応を停止させた後、492nmの吸光度を測定した。

【0069】なお、測定に用いたヒト血漿は、酸化LD

L値が21.0、68.2および117.8ng/mlと測定された検体であった。ヒト血漿非存在下で得られたPC9CHO量に対する各ヒト希釈血漿存在下で測定されたPC9CHO量の割合をPC9CHO残存率として求め、検体の希釈率に対してプロットし図4を得た。図4に示されるように、ヒト血漿中の総酸化ホスファチジルコリン量は、残存PC9CHOの割合が50%を与える血漿の希釈率としてそれぞれ求めたところ、酸化LDL値と良い相関関係が認められた。

#### 【0070】

【発明の効果】以上述べたように本発明は、リン脂質を人工的に酸化させて得られた化合物および/または当該化合物を血漿タンパク質へ組込んだものを測定の標準物質として用い、血液成分と酸化リン脂質を認識する抗体を接触させ、該抗体の該試料に対する反応性を測定することにより定量的に血液中の酸化リポタンパク質の検出を行なう方法に関し、また、その検出法を用いて、粥状硬化症を主因とする各種循環器系疾患を診断する方法に関するものである。このような循環器系疾患としては、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患、末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患まで、全ての循環器系疾患がある。実施例に示すように、本発明により、これらの循環器系疾患の患者の血液中に高濃度の酸化LDLが検出され、このような疾患と酸化リポタンパク質の因果関係が明確になった。しかし、本発明の効果は、これに限定されるものではなく、およそ酸化リポタンパク質が関与する全ての疾患が適用になるのであり、その疾患の範囲は、本発明を用いた今後の臨床的検討により拡大するものであることはいうまでもない。また、上記のごとき標準物質を用いることで検体中の酸化リン脂質量を定量することも可能であるため、この定量結果を合せて考慮すれば、上記のごとき疾患の診断においてより高い確実性が期待できるものとなる。

#### 【図面の簡単な説明】

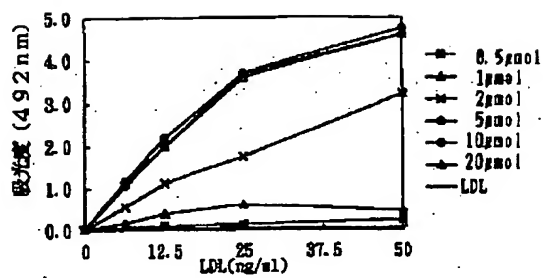
【図1】 本発明の実施例1において調製された酸化リン脂質(PC9CHO)のLDLに対する添加量と抗体反応性との関係を示すグラフ、

【図2】 本発明の実施例1において得られた酸化LDL(PC9CHO-LDL)を標準品とした検量線、

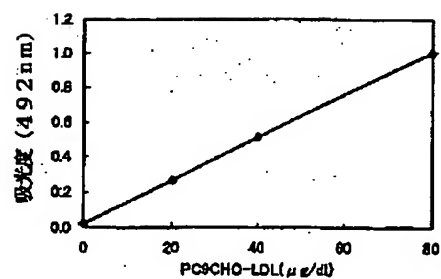
【図3】 本発明の実施例1において臨床検体について分析した結果を示すグラフ、

【図4】 本発明の実施例2において得られた血漿希釈率と標準品残存率との関係を示すグラフ。

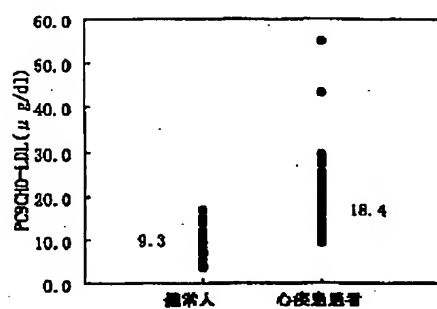
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

